

**Untersuchungen zu Mechanismen der Grüntee-  
vermittelten Chemoprävention in humanen Kolonzellen  
unterschiedlichen Transformationsgrades**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Dipl. troph. Tanja Kautenburger  
geboren am 10. August 1974 in  
Saarburg

---

Dekanin: Prof. Dr. Gabriele Dieckert

1. Gutachter: Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel, Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Frank D. Böhmer, Jena

3. Gutachter: Prof. Dr. Pablo Steinberg, Potsdam

Datum der Disputation: 31.03 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XI</b>
<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 KARZINOGENESE .....	1
1.1.1 Kolonkarzinogenese.....	1
1.1.2 Einflussfaktoren der Karzinogenese.....	2
1.1.2.1 Positive Einflussgrößen auf die Karzinogenese .....	3
1.1.2.2 Negative Einflussgrößen auf die Karzinogenese .....	3
1.2 DAS PRINZIP DER CHEMOPRÄVENTION .....	4
1.3 GRÜNTEE .....	5
1.3.1 Allgemeines .....	5
1.3.2 Polyphenole.....	6
1.3.3 Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Grüntee catechinen .....	7
1.4 SIGNALTRANSDUKTIONSMCHANISMEN UND TRANSKRIPTIONSFAKTOREN .....	8
1.4.1 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP Kinasen).....	8
1.4.2 Aktivator Protein 1(AP-1) .....	10
1.4.3 Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 .....	10
1.4.4 AP-1-vermittelte Genexpression.....	11
1.4.5 Die Rolle von MAP Kinasen und AP-1 in der Regulation des Zellwachstums .....	12
1.5 BIOTRANSFORMATION.....	13
1.5.1 Glutathion S-Transferasen (GSTs) .....	13
1.5.1.1 Einteilung, Familien, Nomenklatur .....	13
1.5.1.2 Funktion der GSTs.....	14
1.5.1.3 Induzierbarkeit und Regulation der GSTs.....	15
1.5.2 Uridindiphosphatglukuronosyltransferasen (UGTs).....	16
1.5.2.1 Einteilung, Familien, Nomenklatur .....	16
1.5.2.2 Funktion der UGTs.....	16
1.5.2.3 Induzierbarkeit und Regulation der UGTs.....	17
1.6 GRÜNTEE-ASSOZIIERTE KREBSPRÄVENTION .....	17
1.6.1 Epidemiologische Datenlage.....	17
1.6.2 Mechanismen der Grüntee-assoziierten Krebsprävention in vitro .....	19
1.6.3 Modulation von MAPK Kaskaden und AP-1-verwandter Aktivitäten.....	19
1.6.4 Modulation des Transkriptionsfaktorkomplex Nukleärer Faktor $\kappa B$ (NF $\kappa B$ ) .....	20
1.6.5 Modulation der Apoptose .....	20
1.6.6 Modulation des Zellzyklus .....	21
1.6.7 Interaktion von Grüntee catechinen mit Oberflächenrezeptoren.....	21

<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.1	MATERIAL .....	25
3.1.1	Chemikalien .....	25
3.1.2	Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen .....	25
3.1.3	Kits .....	26
3.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze .....	26
3.1.5	DNA- und Proteinstandards .....	26
3.1.6	Membranen .....	26
3.1.7	Filmmaterial .....	26
3.2	METHODEN .....	27
3.2.1	Zellkultur .....	27
3.2.1.1	Kultivierung von LT97 Zellen .....	27
3.2.1.2	Kultivierung von HT29-Zellen und HT29 clone 19 a Zellen .....	27
3.2.2	Testsubstanzen .....	27
3.2.3	Zellzahlbestimmung .....	28
3.2.4	Zytosensor Mikrophysiometrie .....	28
3.2.5	Proliferationstests .....	30
3.2.5.1	DNA-Färbung mit DAPI .....	30
3.2.5.2	Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in Mikrotiterplatten .....	30
3.2.5.3	Zellzahlbestimmung .....	30
3.2.6	Proteinbiochemische Methoden .....	30
3.2.6.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen .....	30
3.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford (modifiziert für Western Blot) .....	31
3.2.6.3	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
3.2.6.4	Immunoblotting .....	31
3.2.6.5	Stripping von Membranen .....	32
3.2.6.6	Auswertung und Dokumentation der Western Blots .....	32
3.2.7	Molekularbiologische Grundtechniken .....	33
3.2.7.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen mit TriZol Reagenz .....	33
3.2.7.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen .....	33
3.2.7.3	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes .....	33
3.2.7.4	Herstellung der cRNA-Sonden mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	33
3.2.7.5	Auftrennung der RNA im Agarose-Gel .....	34
3.2.7.6	Blotting .....	35
3.2.7.7	Hybridisierung .....	36
3.2.7.8	Auswertung und Dokumentation .....	36
3.2.8	Bestimmung der GST-Gesamtaktivität .....	36
3.2.9	Bestimmung der UGT-Gesamtaktivität .....	37
3.2.9.1	Gewinnung des mikrosomalen Proteins .....	38
3.2.9.2	Messung der UGT-Aktivität .....	38
3.2.10	Reportergenassay .....	39
3.2.11	ELISA zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren .....	40

3.2.12	<i>Arraytechnik zum Nachweis der Genexpression in HT29 und LT97 Zellen</i>	41
3.2.12.1	In-vitro Transkription und Dot-Blot	42
3.2.12.2	Hybridisierung und Detektion	42
3.2.12.3	Auswertung und Dokumentation	42
3.2.13	<i>Ergebnisdarstellung und Auswertung</i>	43
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
4.1	EINFLUSS VON GRÜNTEEKATECHINEN AUF DIE REZEPTOR-LIGANDEN-INTERAKTION UND MAP KINASE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE	45
4.1.1	<i>Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grünteeekatechine</i>	45
4.1.2	<i>Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grünteeextrakt, epidermalen Wachstumsfaktor und die Kombination aus beiden Substanzen</i>	46
4.1.3	<i>Charakterisierung von LT97 Zellen mit Hilfe der Zytosensor Mikrophysiometrie</i>	48
4.1.4	<i>GTE- bzw. EGCG-vermittelte Modulation der Aktivität der MAP Kinasen ERK, JNK und p38</i>	49
4.2	GTE-BZW. EGCG-VERMITTELTE MODULATION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS AP-1 IN HUMANEN KOLONZELLINIEN	53
4.2.1	<i>Einfluss von GTE und EGCG auf die mRNA Expression der AP-1-Untereinheiten c-jun und c-fos</i>	53
4.2.2	<i>Einfluss von GTE und EGCG auf die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 an TRE55</i>	
4.2.3	<i>Identifizierung der an der AP-1-Aktivität beteiligten AP-1-Untereinheiten und Einfluss von GTE auf deren Bindungsaktivität an TRE</i>	56
4.3	EINFLUSS VON GTE AUF DIE EXPRESSION VON FREMDSTOFFMETABOLISMUS-ASSOZIIERTEN GENEN IN KOLONZELLEN	57
4.3.1	<i>Etablierung eines cDNA Arrays zur Erfassung der Wirkung von GTE auf die Expression von Fremdstoffmetabolismus-relevanten Genen in Kolonzellen</i>	57
4.3.2	<i>Einfluss von GTE auf die Expression GSTP1 in humanen Kolonzelllinien</i>	63
4.3.2.1	mRNA-Expression der GSTP1 in humanen Kolonzelllinien	63
4.4	FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN EINER GRÜNTEEKATECHINBEHANDLUNG IN KOLONZELLEN	64
4.4.1	<i>Modulation der GST-Enzymaktivität in humanen Kolonzelllinien</i>	64
4.4.2	<i>Einfluss von GTE und EGCG auf die UGT-Aktivität in den Kolonzelllinien LT97 und HT29</i>	65
4.4.3	<i>Wachstumsmodulierende Effekte an humanen Kolonzellen</i>	67
4.4.3.1	Einfluss von GTE und EGCG auf das Wachstum von humanen Kolonzelllinien	67
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>72</b>
5.1	GRÜNTEEKATECHINE BEEINFLUSSEN DIE METABOLISCHE AKTIVITÄT UND FÜHREN ZUR AKTIVIERUNG VON MAP KINASEN IN KOLONZELLEN	72
5.1.1	<i>Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grünteeekatechine</i>	72
5.1.1.1	Grünteeekatechine beeinflussen die metabolische Aktivität von Kolonzellen	72
5.1.1.2	GTE hemmt die Bindung von EGF an seinen Rezeptor in HT29 und HT29 clone 19a Zellen nicht	74
5.1.1.3	Charakterisierung von LT97 Zellen mit Hilfe der Zytosensor Mikrophysiometrie	75
5.1.2	<i>Grünteeekatechine beeinflussen die Aktivität der MAP Kinasen ERK, JNK und p38</i>	75
5.1.2.1	Einfluss von GTE und EGCG auf die Modulation der MAPK ERK	75
5.1.2.2	Einfluss von GTE und EGCG auf die Aktivierung der MAPK JNK	77
5.1.2.3	Einfluss von GTE und EGCG auf die Aktivierung der MAPK p38	77

5.2	GTE FÜHRT ZUR MODULATION DER EXPRESSION UND BINDUNGSAKTIVITÄT VON AP-1 BZW. VON SEINEN UNTEREINHEITEN.....	78
5.2.1	<i>GTE moduliert die mRNA-Expression von c-fos und hemmt die Bindungsaktivität von c-Fos an das TRE</i>	78
5.2.2	<i>GTE induziert die mRNA-Expression von c-jun und steigert die Bindungsaktivität von c-jun an das TRE</i>	80
5.2.3	<i>Grüntee catechine induzieren die Bindungsaktivität von FosB an das TRE in HT29 Zellen.....</i>	81
5.2.4	<i>GTE und EGCG erhöhen die AP-1-Bindungsaktivität.....</i>	82
5.3	GTE WIRKT AUF DIE EXPRESSION VON FREMDSTOFFMETABOLISMUS-RELEVANTEN ENZYMEN IN KOLONZELLEN .....	83
5.3.1	<i>Differenzielle Genexpression in Kolonzellen - cDNA-Array-Screening.....</i>	83
5.3.1.1	ABCC2 – ATP binding cassette transporter oder Multidrug resistant protein 2 (MRP2) .....	83
5.3.1.2	EPHX1 – mikrosomale Epoxid Hydrolase 1 .....	84
5.3.1.3	CHST7 – carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7 (Chondroitin 6-Sulfotransferase 2; C6ST2).....	84
5.3.1.4	RPL13A – Ribosomales Protein L 13A .....	84
5.3.1.5	SULT1A1 – Sulfotransferase 1A1 .....	85
5.3.1.6	LOC51126-N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, S. cerevisiae) .....	85
5.3.2	<i>Grüntee catechine modulieren die Expression der GSTP1 mRNA sowie die GST-Aktivität in Kolonzellen .....</i>	86
5.3.3	<i>Grüntee catechine erhöhen die Expression der UGT1A1 in HT29 Zellen, nicht aber in LT97 Zellen</i>	89
5.4	GTE UND EGCG MODULIEREN DAS WACHSTUM VON HUMANEN KOLONZELLEN .....	91
5.4.1	<i>Einfluss von GTE und EGCG auf das Wachstum von Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsstadiums .....</i>	91
5.4.2	<i>Vergleich der Wirkung von GTE und EGCG auf das Wachstum von Kolonzelllinien .....</i>	93
6	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....</b>	94
7	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	97
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	XII
	<b>ANHANG I: GERÄTE, LÖSUNGEN UND PUFFER .....</b>	XXXII
	<b>ANHANG II: TABELLEN UND ABBILDUNGEN .....</b>	XXXIX

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

4-MU	4-Methylumbelliferon
ABC	engl. ATP binding cassette; membranständige Transportpumpen
ACAT1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1
AP	Alkalische Phosphatase
APC	adenomatöse Polyposis coli
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF	engl. Activating transcription factor; aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	AdenosinTriPhosphat
AR	Ansäuerungsrate
AR <sub>max</sub>	maximale Ansäuerungsrate
AR <sub>min</sub>	minimale Ansäuerungsrate
β-ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	engl. bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
CHST7	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7
CRE	engl. cAMP response element, DNA-Bindungsstelle
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag
DCC	engl. deleted in colon cancer, Tumorsuppressorgen
DIG	Digoxigenin
DMEM	engl. Dulbecco's modified eagle medium, Zellkulturmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-desoxyAdenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-desoxyCytidin 5'-Triphosphat
dGTP	2'-desoxyGuanosin 5'-Triphosphat
dNTPs	Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	2'-desoxyThymidin 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin (-)-Gallat
EGF	engl. epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	engl. Epidermal growth factor receptor – Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	engl. enzyme-linked immuno sorbent assay
Em	Emission
EPHX1	Epoxidhydrolase 1
ERK	Extrazellulär-regulierende Kinase
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktion

FCS	engl. fetal calf serum, fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerin Aldehyd Phosphatdehydrogenase
GK	Golubkriterium
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IEGs	engl. immediate early genes, Transkriptionsfaktoren
JNK	c-jun N-terminale Kinase
KDa	Kilodalton
K-ras	Proto-Onkogen
LiCl	Lithiumchlorid
m%	Massenprozent
MARE1/2	engl. MAF-recognition element 1/2, DNA-Bindungs-stelle
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
MOPS	4-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MRP2	engl. multidrug resistant protein 2, membran-ständige Trans- portpumpe
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaEDTA	Natriummethylen-diamin-tetraessigsäure
n.d.	nicht detektierbar
NFκB	Nuklearer Faktor kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
N-OH-PhIP	N-Hydroxy-PhIP
n.s.	nicht signifikant
n.u.	nicht untersucht
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p38	Mitogen aktivierte Proteinkinase p38, 38kD groß
P53	Gen, das für das Protein P53 kodiert; Tumorsuppressorgen
PBS	engl. phosphate-buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlö- sung
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
pERK	phosphorylierte ERK
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-(4,5-β)-pyridine
pJNK	phosphorylierte JNK
pp38	phosphoryliertes p38 Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	Ribosomales Protein 13A
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SEAP	sezernierende Alkalische Phosphatase
SEM	engl. standard error mean; Standardfehler
SU	engl. „Signal Unit“, Maß für die Spot-Intensität
SULT1A1	Sulfotransferase 1A1



T	Temperatur
T7	RNA Polymerase Promoter Sequenz des Bakteriophagen T7
TBS	engl. Tris-buffered-saline
TBS/T	engl. Tris-buffered-saline/Tween
TPA	12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat
TRE	TPA-responsives Element
Tris	Tris[hydroxymethyl]amino-methan
UDPGA	Uridin Diphosphat Glukuronsäure
UGT	Uridin Diphosphat-Glukuronosyl Transferase
UGT1A1	Uridin Diphosphat Glukuronosyl Transferase 1A1
UTP	Uridin-Triphosphat
UDP	Uridin-Diphosphat
w/v	(engl.) weight per volume; Gewicht pro Volumen
v/v	(eng.) volume per volume, Volumen pro Volumen

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SEQUENZIELLE MUTATIONEN VON TUMORGENEN UND DIE WAHRSCHEINLICHKEIT IHRES AUFTRETENS BEI DER ENTWICKLUNG KOLOREKTALER KARZINOME.....	1
ABBILDUNG 2: EINFLUSSFAKTOREN DER KREBSENTSTEHUNG .....	2
ABBILDUNG 3: GRUNDSTRUKTUR DER FLAVONOIDE AM BEISPIEL DES FLAVANOLS .....	7
ABBILDUNG 4: STUKTUR VON KATECHINEN AUS GRÜNTEE .....	7
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WICHTIGSTEN MAPK SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE .....	9
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE BASENPAARSEQUENZEN VON AP-1-BINDUNGSSTELLEN.....	12
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER GST-KATALYSIERTEN REAKTION .....	14
ABBILDUNG 8: STRUKTUR DES PROMOTERS DER HUMANEN GSTP1 .....	15
ABBILDUNG 9: SCHEMA DER UGT-KATALYSIERTEN REAKTION .....	16
ABBILDUNG 10: SCHEMA DER METABOLISCHEN PROZESSE, DIE MITTELS ZYTOSENSOR-MIKROPHYSIOMETRIE ERFASST WERDEN .....	29
ABBILDUNG 11: GST-VERMITTELTE KONJUGATION VON CDNB MIT GSH ZU S-2,4-DINITROPHENYLGLUTATHION UND CHLORWASSERSTOFF .....	37
ABBILDUNG 12: STRUKTURFORMEL VON 4-MU.....	38
ABBILDUNG 13: RESTRICTION MAP VON PAP1-SEAP.....	39
ABBILDUNG 14: PRINZIP DES ELISA ZUR DETEKTION VON AP-1-UNTEREINHEITEN.....	41
ABBILDUNG 15: FLIEBSHEMA DER ARRAY-METHODE .....	41
ABBILDUNG 16: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER ANGEWENDETEN METHODEN .....	44
ABBILDUNG 17: METABOLISCHE AKTIVITÄT VON HT29 ZELLEN WÄHREND DER INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN TEEKATECHINEN, SYNTHETISCHEN GTE UND GTE.....	45
ABBILDUNG 18: METABOLISCHE AKTIVITÄT VON HT29 CLONE 19 A ZELLEN WÄHREND DER INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN TEEKATECHINEN, SYNTHETISCHEN GTE UND GTE.....	46
ABBILDUNG 19: METABOLISCHE AKTIVITÄT VON HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT DMEM, 2 µM EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE, 1 nM EGF UND DER KOMBINATION AUS 2 µM EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE UND 1 nM EGF .....	47
ABBILDUNG 20: METABOLISCHE AKTIVITÄT VON HT29 CLONE 19 A ZELLEN NACH INKUBATION MIT DMEM, 2 µM EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE, 1 nM EGF UND DER KOMBINATION AUS 2 µM EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE UND 1 nM EGF .....	47
ABBILDUNG 21: ÄNDERUNG DER EXTRAZELLULÄREN ANSÄUERUNGSRATE IN LT97 NACH INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN EGF.....	49
ABBILDUNG 24: PROTEINEXPRESSION DER PHOSPHORYLIERTEN ERK SOWIE DER GESAMT-ERK DURCH VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN GTE (2 UND 20 µM EGCG-ÄQUIVALENTE) UND EGCG (8 µM) IN LT97 ZELLEN .....	52
ABBILDUNG 25: NORTHERN BLOT ANALYSE ZUR IDENTIFIKATION DER „IMMEDIATE EARLY GENES“ C-JUN UND C-FOS IN HT29 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT GTE BZW. EGCG BIS ZU 60 MIN.....	54
ABBILDUNG 26: NORTHERN BLOT ANALYSE ZUR IDENTIFIKATION DER „IMMEDIATE EARLY GENES“ C-JUN UND C-FOS IN HT29 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT GTE FÜR 24 H .....	54

ABBILDUNG 27: EINFLUSS EINER BEHANDLUNG MIT GTE BZW. EGCG AUF DIE BINDUNGSAKTIVITÄT DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AP-1 UND NFκB IN HT29, GEMESSEN MITTELS REPORTER GEN ASSAY .....	55
ABBILDUNG 28: DNA-BINDUNGSAKTIVITÄT AN AP-1 NACH BEHANDLUNG VON HT29 ZELLEN MIT 0, 2 UND 8 μM EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE .....	56
ABBILDUNG 29: REPRÄSENTATIVE CDNA-ARRAY-MEMBRANEN VON HT29 ZELLEN.....	57
ABBILDUNG 30: REPRÄSENTATIVE CDNA-ARRAY-MEMBRANEN VON LT97 ZELLEN .....	57
ABBILDUNG 31: DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN HT29 NACH BEHANDLUNG MIT 2 μM EGCG- ÄQUIVALENTEN GTE; SCATTER PLOT; .....	58
ABBILDUNG 32: DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN HT29 ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT 8 μM EGCG- ÄQUIVALENTEN GTE; SCATTER PLOT.....	59
ABBILDUNG 33: DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN LT97 NACH BEHANDLUNG MIT 2 μM EGCG- ÄQUIVALENTEN GTE; SCATTER PLOT.....	59
ABBILDUNG 34: DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN LT97 NACH BEHANDLUNG MIT 8 μM EGCG- ÄQUIVALENTEN GTE; SCATTER PLOT.....	60
ABBILDUNG 35: BASALEXPRESSION DER GENE, DIE MITTELS CDNA ARRAY IN HT29 BZW. LT97 ZELLEN IDENTIFIZIERT WERDEN KONNTEN.....	61
ABBILDUNG 36: NORTHERN BLOT ANALYSE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER GSTP1 IN HT29 ZELLEN NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT GTE (24 H, 48 H) .....	63
ABBILDUNG 37: NORTHERN BLOT ANALYSE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER GSTP1 IN LT97 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT GTE (24 H, 48 H) .....	64
ABBILDUNG 38: MODULATION DER GST-AKTIVITÄT AUF DER BASIS DER ZELLZAHL IN LT97, HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN DURCH GTE.....	64
ABBILDUNG 39: UGT-AKTIVITÄT IN HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT GTE BZW. EGCG UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN. ....	65
ABBILDUNG 40: UGT-AKTIVITÄT IN LT97 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT GTE UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN. ....	66
ABBILDUNG 41: ZELLQUANTIFIZIERUNG ÜBER DIE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES IN LT97, HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT GTE (BIS 20 μM EGCG-ÄQUIVALENTE) NACH 24 H, 48 H UND 72 H UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN, GEMESSEN MITTELS DNA-DAPI-FÄRBUNG.....	68
ABBILDUNG 42: ZELLQUANTIFIZIERUNG ÜBER DIE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES IN LT97, HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT EGCG (BIS 20 μM) NACH 24, 48 UND 72 H UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN, GEMESSEN MITTELS DNA-DAPI-FÄRBUNG .....	68
ABBILDUNG 43: BRdU-EINBAU ALS MAß FÜR DIE DNA-SYNTHESE IN HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT GTE (BIS 20 μM EGCG-ÄQUIVALENTE) NACH 24 UND 48H UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN.....	69
ABBILDUNG 44: BRdU-EINBAU ALS MAß FÜR DIE DNA-SYNTHESE IN HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT EGCG (BIS 20 μM) NACH 24 UND 48H UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN .....	69
ABBILDUNG 45: GESAMTZELLZAHL VON LT97 UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT GTE (2, 8, 20 μM EGCG-ÄQUIVALENTE) NACH 24 UND 48 H UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN, GEMESSEN MITTELS TRYPANBLAU-AUSSCHLUSS-TEST .....	70

ABBILDUNG 46: ZELLQUANTIFIZIERUNG ÜBER DIE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES IN HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT GTE (BIS 20  $\mu$ M EGCG-ÄQUIVALENTE) NACH 24, 48 UND 72 H UNTER SERUMHALTIGEN BEDINGUNGEN (10 % FCS), GEMESSEN MITTELS DNA-DAPI-FÄRBUNG.....XLVIII

ABBILDUNG 47: ZELLQUANTIFIZIERUNG ÜBER DIE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES IN HT29 CLONE 19 A UND HT29 ZELLEN NACH INKUBATION MIT EGCG (BIS 20  $\mu$ M) NACH 24, 48 UND 72 H UNTER SERUMHALTIGEN BEDINGUNGEN (10 % FCS), GEMESSEN MITTELS DNA-DAPI-FÄRBUNG .....XLVIII

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EPIDEMIOLOGISCHE BEWEISLAGE FÜR DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN WICHTIGEN NAHRUNGSFAKTOREN UND KREBS DER HÄUFIGSTEN LOKALISATIONEN	3
TABELLE 2: BESTANDTEILE VON GRÜNTEE IN M%	6
TABELLE 3: HERSTELLUNG DER IN DER ARBEIT VERWENDETEN TESTSUBSTANZEN	28
TABELLE 4: FESTLEGUNG ZUR QUANTIFIZIERUNG DER MAP KINASEN AKTIVITÄT	33
TABELLE 5: SCHEMA RT-PCR-ANSATZ	34
TABELLE 6: PCR-BEDINGUNGEN DER IN-VITRO-TRANSKRIPTION	34
TABELLE 7: STANDARDISIERTES REAKTIONSSYSTEM (KÜVETTE)	37
TABELLE 8: AUFBAU DES STANDARDISIERTEN REAKTIONSSYSTEMS IN DEN KAVITÄTEN EINER MIKROTITERPLATTE	38
TABELLE 9: VERGLEICH VON HT29 CLONE 19A UND HT29 ZELLEN HINSICHTLICH DER MAXIMAL ( $AR_{MAX}$ ) BZW. MINIMAL ( $AR_{MIN}$ ) ERREICHTEN ANSÄUERUNGSRATEN NACH BEHANDLUNG MIT DEN TESTSUBSTANZEN	48
TABELLE 10: DARSTELLUNG DER WESTERN BLOT ERGEBNISSE ZUR IDENTIFIZIERUNG DES PHOSPHO- RYLIERUNGSSTATUS DER DREI MAP KINASEN ERK, JNK UND P38 IN HT29 ZELLEN	53
TABELLE 11: GTE-VERMITTELTE MODULATION DER GENEXPRESSION IN HT29 UND LT97 ZELLEN	62
TABELLE 12: ÜBERSICHT ÜBER DIE UGT-AKTIVITÄT IN HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT GTE BZW. EGCG UNTER SERUMFREIEN UND SERUMHALTIGEN BEDINGUNGEN.	66
TABELLE 14: ZUSAMMENSETZUNG DES GTE UND DES SYNTH. GTE	XXXIX
TABELLE 15: VERWENDETE OLIGONUKLEOTID-SEQUENZEN	XXXIX
TABELLE 16: ANORDNUNG DER GENE AUF DEM „DRUG METABOLISM AND TOXICOLOGY“-ARRAY DER FIRMA SUPERARRAY	XL
TABELLE 17: ÜBERSICHT ÜBER DIE IM „DRUG METABOLISM AND TOXICOLOGY“-ARRAY DER FIRMA SUPERARRAY VERWENDETEN GENE	XL
TABELLE 18: DURCH GRÜNTEEKATECHINE BZW. EGCG INDUZIERTER MODULATION DER AKTIVITÄT DER ERK IN HUMANEN ZELLINIEN UNTERSCHIEDLICHEN TRANSFORMATIONSTADIUMS	XLIV
TABELLE 19: DURCH GRÜNTEEKATECHINE BZW. EGCG INDUZIERTER MODULATION DER AKTIVITÄT DER JNK IN HUMANEN ZELLINIEN UNTERSCHIEDLICHEN TRANSFORMATIONSGRADEN	XLV
TABELLE 20: DURCH GRÜNTEEKATECHINE BZW. EGCG INDUZIERTER MODULATION DER AKTIVITÄT DER P38 IN HUMANEN ZELLINIEN UNTERSCHIEDLICHEN TRANSFORMATIONSGRADEN	XLVI
TABELLE 21: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERGLEICHENDE AUSWERTUNG DER CDNA ARRAYS (N=2) VON HT29 UND LT97 ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT 2 $\mu$ M BZW. 8 $\mu$ M EGCG-ÄQUIVALENTEN GTE	XLVII
TABELLE 22: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER GSTP1 mRNA EXPRESSION IN HT29 UND LT97 ZELLEN	XLVIII
TABELLE 23: DIE DURCH EGCG VERURSACHTE WACHSTUMSHEMMUNG ( $EC_{50}$ ) IN HUMANEN KREBSZELLINIEN	XLIX

# 1 Einleitung

In den westlichen Industrienationen stehen Krebserkrankungen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems immer noch an zweiter Stelle der Todesursachen. Eine der am häufigsten vorkommenden Krebserkrankungen ist der kolorektale Krebs. Diese zu den ernährungsabhängigen Krebsarten gehörende Tumorerkrankung ist bei beiden Geschlechtern die häufigste Krebs-Todesursache. Jährlich erkranken etwa 23000 Männer und 29000 Frauen in Deutschland an Kolonkrebs.

## 1.1 Karzinogenese

### 1.1.1 Kolonkarzinogenese

Im Allgemeinen sind Tumoren klonaler Natur, d.h. sie entwickeln sich aus einer einzigen Zelle. Diese Zelle erwirbt nach und nach Mutationen bzw. epigenetische Veränderungen, die bestimmte zelluläre Wege oder Prozesse beeinflussen. Für die Entwicklung eines bestimmten Tumortyps können einzelne Prozesse essentiell sein. Im Jahre 1990 wurde von Fearon und Vogelstein ein genetisches Modell der Kolonkarzinogenese postuliert, welches Mutations- und Deletionsereignisse in den Tumorsuppressorgenen *APC*, *DCC* und *p53* sowie im Proto-Onkogen *K-Ras* als molekulare Ursache für Kolonkrebs beschreibt (Fearon und Vogelstein, 1990).

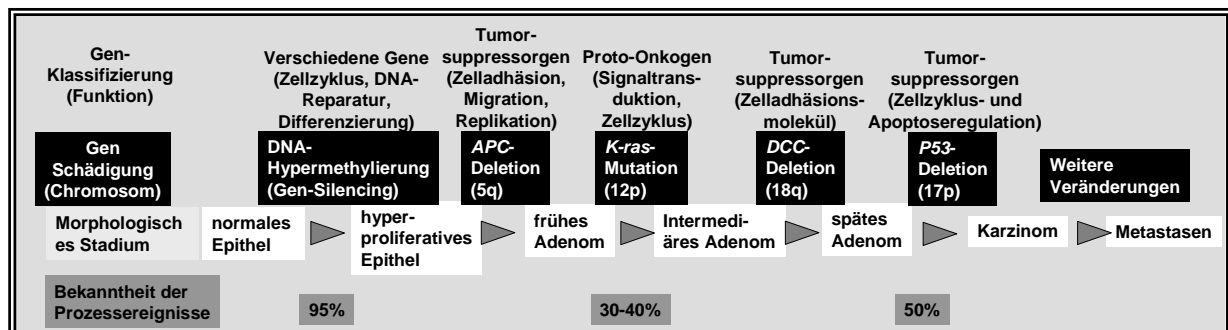


Abbildung 1: Sequenzielle Mutationen von Tumorgenen und die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens bei der Entwicklung kolorektaler Karzinome

(modifiziert nach (Fearon und Vogelstein, 1990; Jass, 2002))

Auch wenn der Prozess der Kolonkarzinogenese eher kumulativ als geordnet abläuft, scheinen bestimmte Ereignisse in der Zelle wie z.B. die DNA-Hypermethylierung und eine Deletion im *APC* generell eher frühe Ereignisse zu sein, während der Verlust von *p53* ein spätes Ereignis in der Kolonkrebsentstehung ist (AICR, 1997).

### 1.1.2 Einflussfaktoren der Karzinogenese

Die Krebsentstehung wird wesentlich durch Umweltfaktoren beeinflusst und ist damit der Prävention zugänglich. Die Ernährungsweise wird für ca. 35 % aller Krebsfälle verantwortlich gemacht (Abbildung 2) (Doll und Peto, 1981).

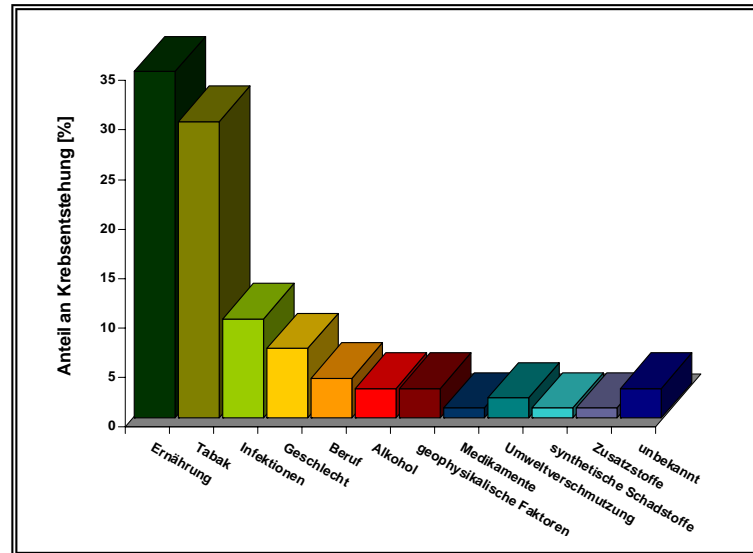


Abbildung 2: Einflussfaktoren der Krebsentstehung  
(modifiziert nach Doll und Peto, 1981)

Der hohe Einfluss von Diät und Lebensstil zeigte sich bereits in frühen Migrationsstudien. Migranten, die aus Ländern mit einer niedrigen Inzidenz für Kolonkrebs in Länder mit einer hohen Inzidenz auswandern, nehmen schnell die Inzidenzen des „Gastlandes“ an (Haenszel und Kurihara, 1968). Slattery schätzte im Jahre 2000, dass für 12 % aller Kolonkrebserkrankungen der Verzehr der sogenannten „Western Style Diet“, einer Ernährung, die arm an Ballaststoffen und Gemüse, aber reich an Fleisch, Weissmehlprodukten, Zucker und verarbeiteten Lebensmitteln ist, verantwortlich gemacht werden kann. Weitere 13 % der Kolonkrebs-erkrankungen führt Slattery auf physische Inaktivität zurück. (Slattery, 2000). Auf der einen Seite gilt eine falsche Ernährungsweise als einer der wichtigsten Einflussfaktoren für die Entstehung von Krebs, andererseits gilt es als gesichert, dass der Verzehr von bestimmten Lebensmitteln mit einem geringeren Risiko gegenüber bestimmten Krebsarten assoziiert ist und man hier so von einer „Krebsprävention durch Nahrungsinhaltsstoffe“ sprechen kann. Die epidemiologische Beweislage für den Zusammenhang zwischen verschiedenen Krebsarten und wichtigen Nahrungsfaktoren ist in Tabelle 1 dargestellt.

*Tabelle 1: Epidemiologische Beweislage für den Zusammenhang zwischen wichtigen Nahrungsfaktoren und Krebs der häufigsten Lokalisationen*

*(nach WSCF & AICR (1997), modifiziert nach Eichholzer, 2000)*

LOKALISATION	OBST/ GEMÜSE <sup>1</sup>	ADIPO- SITAS <sup>2</sup>	ALKO- HOL	SALZ	FLEISCH <sup>3</sup>	BALLAST- STOFFE	FETT/TIER- ISCHES FET
Oberer Atmungs- Verdauungstrakt	---		+++				
Magen	---			++	+		
Kolon/Rektum	---	+	++		++	-	+
Lunge	---		+				+
Brust	--	++	++		+	-	+
Endometrium	-	+++					+
Prostata	-				+		+

<sup>1</sup>für den kolorektalen und den Prostatakrebs zeigen sich vor allem Zusammenhänge mit dem Gemüsekonsum,

<sup>2</sup>Zusammenhänge für den Brustkrebs in der Menopause, <sup>3</sup>vor allem rotes Fleisch (meist definiert als Fleisch von Rind, Schwein oder Lamm), gegrilltes und verarbeitetes Fleisch; --- überzeugende Beweislage für eine inverse Beziehung; -- wahrscheinlicher inverser Zusammenhang; - möglicher inverser Zusammenhang; +++ überzeugender direkter Zusammenhang; ++ wahrscheinlicher direkter Zusammenhang; + möglicher direkter Zusammenhang

### 1.1.2.1 Positive Einflussgrößen auf die Karzinogenese

Ein hoher Body Mass Index (BMI) steht mit einem signifikant höheren Sterberisiko für Krebsarten der Verdauungsorgane in einem engen Zusammenhang. Ein erhöhtes Risiko bei Übergewicht wurde auch für Krebserkrankungen von Brust, Gebärmutter und Eierstock sowie der Prostata festgestellt. Bergstrom et al. schätzten im Jahr 2001, dass alleine in Europa 36000 Krebsfälle durch eine Halbierung der Prävalenz für Übergewicht vermeidbar wären (Bergstrom *et al.*, 2001). Nach dem „Harvard Report on Cancer Prevention“ ließe sich durch regelmäßige körperliche Aktivität das Risiko für ein Kolonkarzinom um bis zu 50 % senken (Tomeo *et al.*, 1999). Der Verzehr von rotem Fleisch sowie ein hoher Verzehr von tierischen und gesättigten Fetten gelten als Einflussfaktoren für die Entstehung von kolorektalen Adenomen, der Vorstufe von Adenokarzinomen (Kim und Mason, 1996). Ein hoher Salzkonsum durch den Verzehr von stark gesalzenen Speisen ist mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Magenkrebs assoziiert (Joossens *et al.*, 1996). In einer Fall-Kontroll-Studie in Shanghai wurde gezeigt, dass Rauchen ein Risikofaktor für die Ausbildung von Rektalkrebs, sowie hoher Alkoholkonsum ein Risikofaktor für die Ausbildung von Kolonkrebs darstellt (Ji *et al.*, 2002b).

### 1.1.2.2 Negative Einflussgrößen auf die Karzinogenese

Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, dass der Verzehr von Obst und Gemüse mit einem signifikant geringeren Risiko für die Ausbildung von Krebsarten des Gastrointestinaltrakts assoziiert ist, wobei im Falle von kolorektalen Karzinomen insbesondere dem regelmäßigen Verzehr von



Gemüse eine große Bedeutung beigemessen wird. In einer prospektiven Kohortenstudie an 10998 Vegetariern und Nicht-Vegetariern konnte gezeigt werden, dass bei den Studienteilnehmern, die regelmäßig frisches oder getrocknetes Obst (mehr als fünf Portionen/Woche) konsumierten, das Risiko für die Ausbildung von kolorektalem Krebs um 40 % geringer im Vergleich zu den Studienteilnehmern war, die weniger als fünf Portionen Obst pro Woche aßen (Sanjoaquin *et al.*, 2004). Willett kam dagegen nach der Beurteilung von Fall-Kontroll-Studien, die den Zusammenhang zwischen Gemüseverzehr und Krebsrisiko untersuchten, zu dem Schluss, dass ein hoher Verzehr von möglichst unverarbeitetem Obst und Gemüse zwar wünschenswert, aber eher mit der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als mit der Prävention von Krebserkrankungen verbunden ist (Willett, 2001). Neben Obst und Gemüse gilt ein hoher Verzehr von Ballaststoffen als protektiv gegenüber der Entstehung von kolorektalen Krebserkrankungen. Als Ballaststoffe bezeichnet man Kohlenhydrate, die im menschlichen Darm nicht enzymatisch gespalten werden, das Kolon erreichen und dort von der Darmflora zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, engl. „short chain fatty acids“) abgebaut werden (Elmadfa und Leitzmann, 1998). Anhand eines Literaturvergleichs konnte Nkondjock *et al.* belegen, dass eine erhöhte Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren mit einem erniedrigten Kolonkrebsrisiko assoziiert ist (Nkondjock *et al.*, 2003). Den direkten Einfluss von Ballaststoffen untersuchten Bingham *et al.* in der EPIC-Studie (EPIC, engl. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), einer prospektiven Studie, an der mehr als 500000 Menschen aus 10 verschiedenen europäischen Ländern teilnahmen. Ein Ergebnis dieser Studie war, dass die Aufnahme von Ballaststoffen invers mit der Inzidenz für kolorektale Krebserkrankungen korreliert. Der protektive Effekt war dabei in der linken Seite des Kolon am höchsten (Bingham *et al.*, 2003).

## 1.2 Das Prinzip der Chemoprävention

Der Begriff der Chemoprävention wurde erstmals von Sporn geprägt (Sporn, 1976). Unter Chemoprävention versteht man die Nutzung von chemischen und natürlichen Stoffen mit pharmakologischer Wirkung, um der Entstehung von invasivem Krebs vorzubeugen. Die ideale chemopräventive Substanz für den Menschen sollte wenig bis gar nicht toxisch, hoch wirksam und oral aufzunehmen sein, sie sollte wenig kosten, einen bekannten Wirkmechanismus haben und nicht zuletzt in der Bevölkerung akzeptiert sein (Mukhtar und Ahmad, 1999). Die Mechanismen der Wirkung von Substanzen mit chemopräventivem Potenzial sind noch weitgehend ungeklärt. Wattenberg hat 1993 erstmals zwei unterschiedliche Arten von chemopräventiv wirkenden Agenzien postuliert. Er unterscheidet (1) „Blocking Agents“ und (2) „Suppressing Agents“, wobei „Blocking Agents als Inhibitoren in der ersten Stufe der

Krebsentstehung (Initiationsphase) agieren. „Suppressing Agents“ dagegen greifen erst in den Verlauf der Tumorpromotion bzw. -progression ein (Wattenberg, 1993). Eine Unterscheidung in insgesamt drei verschiedene chemopräventiv wirkende Substanzklassen wurde von Morse und Stoner getroffen. Sie unterschieden die Agentien anhand des Wirkortes der Substanzen innerhalb der Karzinogenese. Neben den bekannten „Blocking Agents“ und „Suppressing Agents“ definierten sie noch die Gruppe der „Inhibitors of Cancer Formation“ (Morse und Stoner, 1993). „Blocking Agents“ verhindern, dass Pro-Karzinogene metabolisch zu Karzinogenen aktiviert werden, sodass diese nicht mit Makromolekülen der Zelle, wie DNA, interagieren können. Isothiocyanate (Kohl), Diallylsulfide (Zwiebeln, Knoblauch), Resveratrol (Trauben) und Indol-3-Carbinol (Brokkoli) gehören zu den „Blocking Agents“. Außerdem zählen zu den „Blocking Agents“ Chlorophyllin (Blattgrün), Ellagsäure (ein Benzoessäurederivat aus Grüntee) sowie Tocopherole (pflanzliche Öle). „Suppressing Agents“ verhindern die Transformation bereits initiiertter Zellen, entweder im Promotions- oder Progressionsstadium (Surh, 2003). Quercetin (Äpfel, Zwiebeln), Monoterpene (z.B. D-Limonen aus Orangen) und Katechine (Grüntee) werden der Gruppe der „Suppressing Agents“ zugerechnet, weil diese Substanzen u.a. das Wachstum von Krebszellen hemmen und Entgiftungsenzyme aktivieren können. Ascorbinsäure, auch bekannt als Vitamin C, kann in keine der drei Kategorien eingeteilt werden, da es sowohl Eigenschaften eines „Blocking Agents“ als auch eines „Suppressing Agents“ sowie eines „Inhibitors of Cancer Formation“ aufweist (Surh, 2003). „Inhibitors of Cancer Formation“ verhindern die Bildung eines Karzinogens aus nicht-karzinogenen Vorstufen, die aber im Gegensatz zu den „Blocking Agents“ nicht durch metabolische Umsetzung erfolgt. Der Großteil der zu dieser Klasse gehörenden Substanzen verhindert die Bildung von Nitrosaminen aus sekundären Aminen sowie Nitrit im sauren Milieu. Ascorbinsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, aber auch N-Acetylcystein und die beiden Aminosäuren Prolin und Thioprolin, die mit Nitrit zu nicht-mutagenen Nitrosaminen reagieren, werden zu den „Inhibitors of Cancer Formation“ gerechnet (Stoner *et al.*, 1997). Neben den Inhaltsstoffen des Grüntee werden auch Inhaltsstoffe des Schwarztee als natürlich vorkommende krebspräventive Agentien diskutiert (Yang und Wang, 1993).

## **1.3 Grüntee**

### **1.3.1 Allgemeines**

Tee bezeichnet den wässrigen Aufguss der unfermentierten (Grüntee), halbfermentierten (Oolong Tee) oder fermentierten Blätter (Schwarztee) der in Asien beheimateten Teesträucher *Camellia sinensis* sowie *Camellia assamica* aus der Familie der *Theaceae*. Tee ist nach Wasser das am meisten konsumierte Getränk weltweit und gewinnt auch in nicht-asiatischen

Ländern immer mehr an Bedeutung. Inhaltsstoffe aus Grüntee werden zudem immer häufiger als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt und auch in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie findet Grüntee steigende Beachtung. Wie Rotwein und Kakao besitzt Grüntee einen hohen Gehalt an Polyphenolen, die für verschiedene gesundheitliche Wirkungen verantwortlich gemacht werden. Neben der antikanzerogenen Wirkung besitzt Tee antioxidative, kardioprotektive, immunmodulierende und entzündungshemmende Eigenschaften, schützt Zähne vor Karies und die Haut vor UV-Licht (Hamilton-Miller, 2001; Yang *et al.*, 2001; Frei und Higdon, 2003; Higdon und Frei, 2003; Katiyar, 2003). Eine Übersicht über die Inhaltsstoffe von Grüntee gibt Tabelle 2. Die Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden mit einem wässrigen Grünteeextrakt durchgeführt, der die in Abbildung 14 dargestellte Zusammensetzung hat (Anhang II) (Glei *et al.*, 2003).

Tabelle 2: Bestandteile von Grüntee in m%

(nach Balentine *et al.*, 1997)

INHALTSSTOFF	MENGE [M%]	INHALTSSTOFF	MENGE [M%]
Katechine	30-42	organische Säuren	2
einfache Polyphenole	2	Zucker	7
Flavonole	2	andere Kohlenhydrate	4
andere Polyphenole	6	Koffein	3-6
Theanine	3	Kalium	5
Aminosäuren	3	andere Mineralstoffe	5-8
Peptide/Proteine	6		

### 1.3.2 Polyphenole

Chemische Verbindungen, die mehr als einen aromatischen Phenolring in ihrer Molekülstruktur aufweisen, werden allgemein als Polyphenole bezeichnet. Es gibt mehr als 8000 verschiedene Verbindungen. Die prominentesten Vertreter der Polyphenole sind die Flavonoide (Abbildung 3), die grundsätzlich aus drei Kohlenstoff-Ringen mit zwei aromatischen (A und B) und einem heterozyklischen O-Ring (C) bestehen (Beecher, 2003). Flavonoide können in Abhängigkeit vom Grad der Oxidation der sauerstoffhaltigen Ringe in verschiedene Klassen unterteilt werden: Flavone (Apigenin, Sellerie), Flavonole (Quercetin, Zwiebel, Tee), Isoflavone (Genistein, Soja), Anthocyanidine (Cyanidin, rote Früchte wie Aronia, schwarze Johannisbeere), Flavanole (Epigallocatechingallat, Grüntee) und Flavanone (Naringenin, Zitrusfrüchte) (Scalbert und Williamson, 2000; Watzl und Rechkemmer, 2001). Die meisten der mehr als 5000 bisher identifizierten Flavonoide kommen in der Natur nicht frei als sogenannte Aglykone, sondern liegen glykosyliert, methyliert, sulfatiert oder verestert vor

(Watzl und Rechkemmer, 2001). Die im Grüntee vorkommenden Flavanole (Abbildung 4) bilden hier eine Ausnahme.

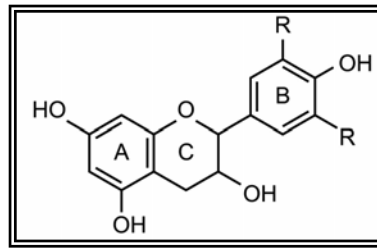


Abbildung 3: Grundstruktur der Flavonoide am Beispiel des Flavanols

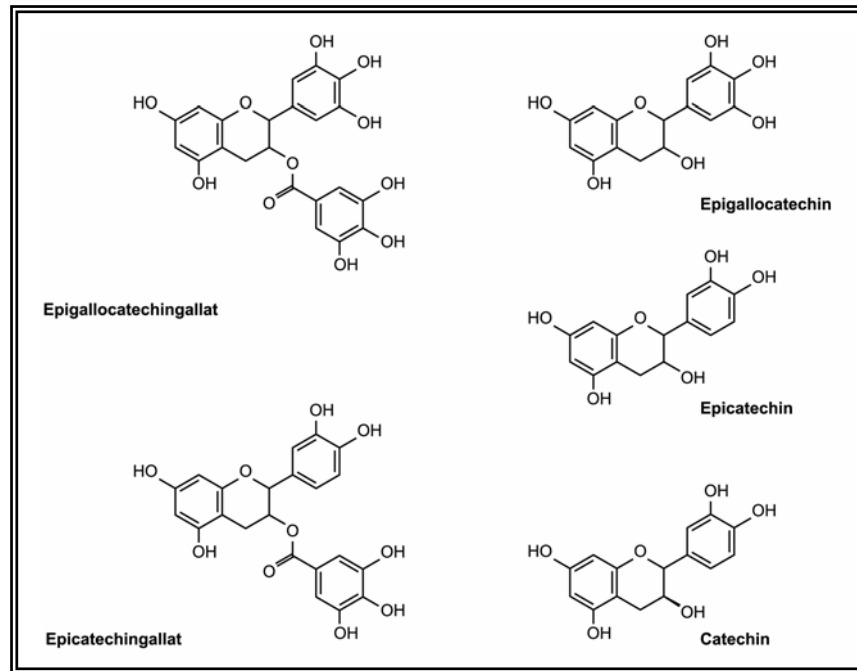


Abbildung 4: Struktur von Katechinen aus Grüntee

### 1.3.3 Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Grüntee catechinen

Insgesamt ist über die pharmakokinetischen Eigenschaften von EGCG und anderen Grüntee catechinen wenig bekannt. Die meisten Studien wurden bisher an Tieren, und hier in erster Linie an Ratten und Mäusen durchgeführt (Yang *et al.*, 2002). Während im Jahr 1999 noch Schätzungen veröffentlicht wurden, die besagten, dass nach dem Konsum von einer Tasse Grüntee EGCG-Plasma-Spiegel von 60  $\mu\text{M}$  erwartet werden können (Lin *et al.*, 1999), konnten Lee *et al.* vor kurzem zeigen, dass nach dem Trinken von mehreren Tassen Grüntee nur bis zu 0,16  $\mu\text{M}$  EGCG, hauptsächlich in freier Form, im Plasma gefunden werden (Lee *et al.*, 2002). In einer von Yang *et al.* durchgeführten Studie tranken 18 gesunde Individuen verschiedene Mengen Grüntee und es wurden zeitabhängig Grüntee catechin-Plasmaspiegel sowie Ausscheidung der Teekatechine über den Urin beobachtet. Nach der Einnahme von 1,5 g entkoffeinierten Grüntee feststoffen betrug die  $C_{\text{max}}$  von EGCG 326 ng/ml (das entspricht

0,72  $\mu\text{M}$ ). Bei Erhöhung der Dosis von 1,5 auf 3 g stieg  $C_{\text{max}}$  um das 2,7 - 3,4-fache, eine Dosiserhöhung auf 4,5 g änderte  $C_{\text{max}}$  nicht signifikant, was für einen Sättigungseffekt spricht. Die Halbwertszeit von EGCG betrug 5 - 5,5 h und war damit doppelt so groß wie die Halbwertszeit von EGC und EC. EGC und EC, nicht aber EGCG wurden über den Urin ausgeschieden (Yang *et al.*, 1998a). In einer weiteren Humanstudie konnten insgesamt nur 1,68 % der durch den Konsum von Schwarzem Tee aufgenommenen Katechine (EGCG, EGC, ECG und EC) in Urin, Plasma und Faeces wiedergefunden werden, die Bioverfügbarkeit der Katechine, die eine Gallatgruppe enthielten, war schlechter als die der Katechine ohne Gallatgruppe. Die Autoren folgerten daraus, dass a) mikrobieller Abbau im Darm eine Ursache für den geringen Gehalt an Katechinen im Faeces sein könnte, b) es im Verlauf des Verdauungsprozesses zu einer Spaltung der Katechine kommen könnte und c) dass Katechine im Verdauungstrakt schnell metabolisiert bzw. absorbiert werden (Warden *et al.*, 2001). Die letzte Hypothese wird durch eine Tierstudie von Zhu *et al.* unterstützt, die die schlechte systemische Bioverfügbarkeit von Katechinen in Ratten als Ergebnis von langsamer Absorption, hohem „First Pass“-Effekt und breiter Verteilung ins Gewebe erklärt haben (Zhu *et al.*, 2000). Aufgrund des direkten Kontaktes von Teeinhaltsstoffen mit dem Gastrointestinaltrakt ist aber anzunehmen, dass diese Gewebe gegenüber höheren Katechingehalten exponiert sind, als systemisch identifiziert wurden (Lambert und Yang, 2003).

## **1.4 Signaltransduktionsmechanismen und Transkriptionsfaktoren**

Signaltransduktion beschreibt den Prozess, durch den Informationen extrazellulärer Signale ins Innere der Zelle über eine Kette von Signalmolekülen geleitet werden. Wird die Zelle z.B. mitogenen Substanzen oder anderen Stimuli ausgesetzt, führt dies in der Zelle zu einer Aktivierung von Mitgliedern der mitogen aktivierten Protein (MAP) Kinasen und hat eine Reihe von Phosphorylierungsschritten zur Folge (Bode und Dong, 2003). Diese Signalweiterleitung wiederum führt zu einer Zellantwort, die oftmals mit der Aktivierung der Transkription von Genen durch Proteine (Transkriptionsfaktoren) einhergeht. Transkriptionsfaktoren sind definiert als Proteine, die an eine spezifische DNA-Sequenz in einem Gen binden und so die Expression eines Gens oder einer Gruppe von Genen positiv oder negativ beeinflussen können. Die Transkription eines Gens ist die bekannteste Antwort auf eine Protein-DNA-Interaktion und wird als „transkriptionelle Aktivierung“ bezeichnet. Transkriptionsfaktoren werden durch Phosphorylierung, Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Liganden aktiviert bzw. inaktiviert.

### **1.4.1 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAP Kinasen)**

MAP Kinasen umfassen eine große Gruppe von miteinander verwandten Proteinen, deren

Hauptfunktionen in der Regulation von Zellwachstum und Zell-differenzierung sowie der Regulation der Bildung von Transkriptionsfaktoren zu sehen sind. Bei den MAP Kinase Kaskaden handelt es sich um hintereinander-geschaltete Reihen von Proteinkinasen, die eine Vielzahl verschiedener extra-zellulärer Signale durch aufeinanderfolgende Phosphorylierungen in intrazelluläre Antworten umwandeln. Die Zelle besitzt so ein sehr flexibles und leistungsfähiges Prinzip, mit dem Signale amplifiziert, diversifiziert und reguliert werden können (Kraus, 1997). Abbildung 5 stellt anhand eines schematischen Zellmodells die drei wichtigsten Hauptklassen von MAP Kinasen, die extrazellulär signal-regulierten Proteinkinasen (ERKs), die c-Jun-N-terminalen Kinasen/stress-aktivierten Proteinkinasen (JNKs/SAPKs) sowie die p38 Kinasen dar (Boulton *et al.*, 1991; Davis, 1993; Kallunki *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994).

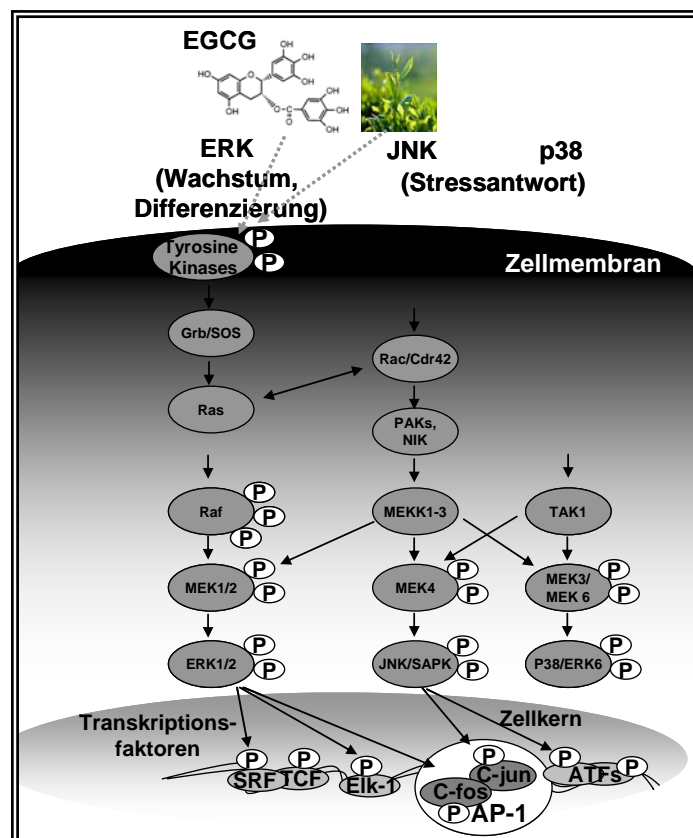


Abbildung 5: Schematische Darstellung der wichtigsten MAPK Signaltransduktionswege

Die Aktivierung der ERKs ist insbesondere verknüpft mit dem Überleben der Zellen, wohingegen die Aktivierung der JNKs sowie der p38 eher als ein erstes Apoptosesignal bzw. eine generelle Reaktion der Zellen auf Stress verstanden wird. Auch wenn verschiedene Studien diese Zweiteilung (ERK versus JNK/p38) propagieren, zeigen viele Ausnahmen, daß dies eine zu starke Vereinfachung ist und die Aufgaben der verschiedenen MAP Kinasen vielmehr zellspezifisch und kontextabhängig sind (Chang und Karin, 2001).

### 1.4.2 Aktivator Protein 1(AP-1)

Der Begriff „Aktivator Protein 1“ steht für zwei verschiedene Dinge: Zum einen trägt ein Transkriptionsfaktor, das sogenannte „activator protein 1“ (AP-1) diesen Namen. Dieser wurde erstmals als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der an ein notwendiges cis-Element im Promoter des humanen Metallothionein 2a (hMT2a) Gens bindet (Lee *et al.*, 1987). Zum anderen bezeichnet man die Stelle im Promoter, an die der Transkriptionsfaktor AP-1 bindet, als AP-1(-Bindungsstelle). Diese Bindungsstelle findet sich in der Literatur auch unter der Bezeichnung TRE (12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate(TPA)-responsives Element), abgeleitet von der ersten identifizierten Funktion des Proteins AP-1 (Angel *et al.*, 1987). Obwohl AP-1 als einer der ersten Transkriptionsfaktoren überhaupt identifiziert wurde (Angel und Karin, 1991), sind die physiologischen Funktionen und vor allem die Zielgene von AP-1 noch längst nicht hinreichend aufgedeckt. Die Fähigkeit eines einzigen Transkriptions-faktors, verschiedene biologische Funktionen zu beeinflussen, stammt in erster Linie von seiner komplexen Struktur ab. Bei AP-1 handelt es sich nicht um ein Protein, sondern um eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen, die zu einem „basic region leucin-zipper“, einem dimeren bZIP-Protein zusammengesetzt sein können. Die Untereinheiten stammen entweder aus der Jun-Familie, die aus den Mitgliedern c-Jun, JunB und JunD besteht, aus der Fos-Familie mit den Mitgliedern c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra2, aus der Maf-Familie oder aus der ATF-Familie. Nur Mitglieder der Jun-Familie können homodimere AP-1 Proteine bilden, in allen anderen Fällen handelt es sich bei AP-1 um ein Heterodimer. Die aus c-jun Untereinheiten bestehenden Homodimere sind dabei von geringerer Stabilität als die Heterodimere aus c-jun und c-fos Untereinheiten (Angel und Karin, 1991). AP-1 werden mit präkanzerogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht, seit gezeigt werden konnte, dass eine hohe AP-1-Aktivität zur Tumorpromotion von verschiedenen Krebsarten führt (Risse-Hackl *et al.*, 1998). Die Aktivierung von AP-1 gilt mittlerweile nicht mehr nur als karzinogen für die Zelle, da gezeigt werden konnte, dass bestimmte Untereinheiten von AP-1 wie JunB und c-fos tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen (Eferl und Wagner, 2003).

### 1.4.3 Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1

Die Regulation von Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien, den „immediate early genes“ auf mRNA-Ebene, die nach Behandlung von Zellen mit extrazellulären Stimuli wie fötalem Kälberserum (FCS) oder Wachstumsfaktoren erfolgt, repräsentiert einen Schritt im transkriptionellen Programm einer Zelle, der zu einer Reihe von zellulären Antworten führen kann. Die schnelle Induktion nach Stimulus hat den „immediate early genes“ ihren Namen gegeben (Muller *et al.*, 1984). Viele Autoren haben beobachtet, dass eine Aktivierung der IEGs nicht

zwangsläufig mit einer Neusynthese des Proteins einhergehen muss. Eine Erhöhung der Expression auf mRNA-Ebene korreliert demzufolge nicht automatisch mit einer Protein-Neusynthese. Es sind vielmehr die signalübertragenden MAP Kinasen, die über die Translokation in den Zellkern das Signal in Form einer Phosphatgruppe auf die entsprechenden Transkriptionsfaktoren übertragen und diese aktivieren. Die transkriptionelle Regulation wird dabei von der posttranslationalen Regulation differenziert. Während erstere über die MAPK-vermittelte Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren erfolgt, die nach ihrer Aktivierung an spezifische DNA-Stellen binden und so die Transkription von IEGs modulieren, erfolgt die posttranslationale Regulation über MAP Kinasen direkt. Es ist gut dokumentiert, dass verschiedene Signaltransduktionskaskaden über die Weitergabe der Signale an AP-1-Proteine in einer veränderten Bindungsaktivität resultieren, die dann wiederum die Regulation der beteiligten AP-1-Untereinheiten ebenso wie die Transkription anderer Gene beeinflusst. Besonders der ERK-Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in der Induktion der IEGs durch die direkte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an die Promotoren der IEGs selbst binden (Whitmarsh *et al.*, 1995). Dies resultiert in einer vorübergehenden Transkription dieser IEGs und nach 30-45 min in einer Expression der Proteine der Fos-, Jun- oder Myc-Familie. Die Signaldauer, z.B. die Dauer der ERK-Phosphorylierung innerhalb der Zelle ist wichtig. Wenn das Signal vorübergehend ist, kommt es nicht zu einer Akkumulation des IEG-Proteins, somit ist das IEG-Protein, wie für c-fos gezeigt werden konnte, instabil und zerfällt – ein Signal dieser Art hat keinen weiteren Einfluss auf die Zelle (Murphy *et al.*, 2002). Untersuchungen an Tieren und Geweben haben gezeigt, dass jede AP-1-Untereinheit durch die Regulation bestimmter Zielgene zelltyp-abhängig spezifische biologische Funktionen ausübt (zusammenfassende Übersicht bei (Karin *et al.*, 1997).

#### **1.4.4 AP-1-vermittelte Genexpression**

Die AP-1 vermittelte Genexpression ist auf zwei verschiedene Arten reguliert. Die Regulation kann über die Phosphorylierung und Aktivierung von einzelnen AP-1-Komponenten, in erster Linie Komponenten der Jun-Familie erfolgen, die Regulation ist aber auch über die Expression der AP-1-Untereinheiten auf mRNA Ebene möglich (Frigo *et al.*, 2003). Jun- und Fos-Proteine werden durch die MAP Kinasen reguliert (Wisdom, 1999). Der Proteinkomplex AP-1 bindet dann z.B. an das TRE, das sich in der Promoterregion von Zielgenen befinden. Neben den TREs gibt es weitere DNA-Bindungsstellen mit spezifischen Sequenzen, die in der Regulation von Genen eine Rolle spielen und von denen man annimmt, dass sie im Laufe der Evolution hoch konserviert wurden (Abbildung 6) (Widmann *et al.*, 1999). Ein sogenanntes „antioxidative responsive element“ (ARE), auch bekannt als „electrophile responsive



element“ (EpRE), setzt sich üblicherweise aus zwei AP-1 oder AP-1-ähnlichen Elementen zusammen, die durch drei oder acht Nukleotide separiert werden und an die eine GC-Box gebunden ist (Jaiswal, 1994). ARE/EpRE-Motive wurden zum einen in Genen gefunden, die in zellulären Prozessen wie der Proliferation eine wichtige Rolle spielen (Cyclin D1, Rb, p16) oder in der Tumor-Invasion (Matrixmetalloproteinasen) involviert sind. Zum anderen wurden AREs vielfach in Promotoren von Genen nachgewiesen, die in der Entgiftung von Fremdstoffen verantwortlich sind (Jaiswal, 1994).

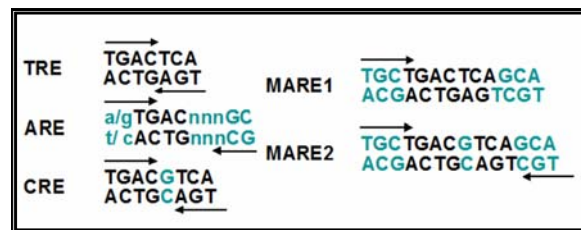


Abbildung 6: Übersicht über die Basenpaarsequenzen von AP-1-Bindungsstellen

(modifiziert nach Eferl und Wagner, 2003)

Lange glaubte man, dass sich die Ergebnisse aus Tierversuchen - die meisten Genpromoterstudien wurden an Ratten durchgeführt - auf den Menschen übertragen lassen. Promoterstudien haben aber gezeigt, dass die Promotoren vieler Gene in Mensch und Ratte verschieden sind und verschieden aktiviert werden. Die Promotersequenzen der Glutathion S-Transferasen (GSTs) sind ein Beispiel für die speziesspezifische Aktivierung. So zeigten Yu et al. bereits 1997 die Grünteepolyphenol-induzierte Induktion des Promoters der minimalen GSTYa Untereinheit der Ratte via ARE über eine Induktion von *c-jun/c-fos*. Außerdem wurde nachgewiesen, dass das Gen der plazentalen GST (GSTP) der Ratte im Promoter eine ARE-Bindungsstelle enthält (Sakai *et al.*, 1988). In den Promotoren der humanen GSTs, soweit bereits identifiziert, wurde allerdings keine ARE-Bindungsstelle, aber eine TRE-Bindungsstelle in den Promotoren der GSTP1-1 und GSTA4-4 gefunden (Moffat *et al.*, 1994).

#### 1.4.5 Die Rolle von MAP Kinasen und AP-1 in der Regulation des Zellwachstums

Es ist bekannt, dass Mitogene, wie z.B. der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), MAP Kinasen aktivieren und so wiederum die Aktivität von verschiedenen AP-1-Untereinheiten verändern können (Oliver *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass eine Flavonoid-vermittelte Hemmung der zuvor durch EGF induzierten MAPK ERK zu einer Wachstumsinhibierung in den untersuchten Zellen führte (Briviba *et al.*, 2002). Die für die Regulation des Zellwachstums entscheidenden AP-1-Untereinheiten werden dabei wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Zelltyp und der verwendeten Substanz reguliert. Eferl und Wagner postulierten kürzlich, dass die Wachstumsregulation eher den Proteinen der JUN-Familie zugeordnet

werden kann und das Proteine der FOS-Familie offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielen (Eferl und Wagner, 2003). Reichelt et al. hingegen berichten von einer 20-fachen Hochregulation der AP-1-Untereinheit FosB durch Pyroglutamyl-Histidyl-Glycin in HT29 Zellen, das als intestinaler Mitose-Inhibitor gleichzeitig das Wachstum der Zellen zu unterdrücken vermag. Die Expression von Proteinen der JUN-Familie war hingegen nicht verändert (Reichelt *et al.*, 2003).

## **1.5 Biotransformation**

Die enzymatische Biotransformation endogener und exogener Substanzen wird in drei Phasen unterteilt. In Phase I werden über Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe transformiert (Funktionalisierungsreaktion, „Bioaktivierung“). Die an der Phase I beteiligten Enzyme führen häufig zu einer Aktivierung von Prokanzerogenen zu den metabolisch aktiveren Karzinogenen. Als wichtige Phase I Enzyme sind die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen, Dehydrogenasen und Epoxidhydrolasen zu nennen (Marquard und Schäfer, 2003). In Phase II, der sogenannten Konjugationsreaktion, werden polare Substrate mit endogenen Molekülen (Glutathion (GSH), Sulfat, Aminosäuren, Glucuronsäure) konjugiert, wodurch in der Regel leichter ausscheidbare, wasserlösliche, Metabolite entstehen. Die Phase II wird auch als Entgiftungsphase bezeichnet. Wichtige Phase II Enzyme sind die GSTs, die Glucuronosyltransferasen sowie die Oxidoreduktasen und Sulfotransferasen (Marquard und Schäfer, 2003). Die Induktion von Phase II Enzymen bzw. die Hemmung von Phase I Enzymen gelten als Hauptmechanismen der Chemoprävention gegen Mutagene und Karzinogene. Die Phase III schließlich wird als Ausscheidungsphase bezeichnet. Zu den Proteinen, die an den Phase-III-Reaktionen beteiligt sind, gehören die membranständigen Transportpumpen wie die Familie der MRPs (engl. „Multidrug Resistant Proteins“), zu denen auch der apikale Transporter MRP2 gehört, dem eine physiologisch bedeutsame Rolle bei der Ausschleusung von GSH-konjugierten Substraten aus der Zelle beigemessen wird (Keppler, 1999; Ji *et al.*, 2002a).

### **1.5.1 Glutathion S-Transferasen (GSTs)**

#### **1.5.1.1 Einteilung, Familien, Nomenklatur**

Die Konjugation von GSH an elektrophile Substrate wird von der Superfamilie der Glutathion S-Transferasen (GSTs) katalysiert, die acht Klassen mit sechzehn verschiedenen löslichen GST-Untereinheiten und sechs membran-assoziierten Proteinen enthalten und von Hayes und Strange detailliert beschrieben wurden (Hayes und Strange, 2000). Die im Cytosol vorkommenden Isoformen werden anhand struktureller Ähnlichkeiten in die Klassen alpha (A), mu (M), kappa (K), omega (O), pi (P), sigma (S), theta (T) und die kürzlich entdeckte Klasse

zeta (Z) eingeteilt (Mannervik und Danielson, 1988; Meyer *et al.*, 1991; Eaton und Bammler, 1999). Daneben gibt es noch membrangebundene Isoformen, die mikrosomalen GSTs und die Leukotrien C4 Synthetase (Hayes und Pulford, 1995; Eaton und Bammler, 1999). GSTs kommen als Homo- oder Heterodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 23–27 kD pro Untereinheit im Cytosol vor und besitzen je Untereinheit eine hydrophile G-site (N-terminal), die für die Bindung von Glutathion verantwortlich ist, eine benachbarte hydrophobe Bindungsstelle für das elektrophile Substrat, die H-site genannt wird (C-terminal) sowie eine Liganden-Bindungsstelle, die sogenannte L-site (Armstrong, 1997).

### 1.5.1.2 Funktion der GSTs

GSTs katalysieren eine Reihe von glutathionabhängigen Reaktionen und übertragen Moleküle des Tripeptids Glutathion (GSH) auf elektrophile Substrate, um so deren Reaktivität zu vermindern und sie damit wasserlöslicher und in der Regel für den Organismus leichter ausscheidbar zu machen (Abbildung 7).

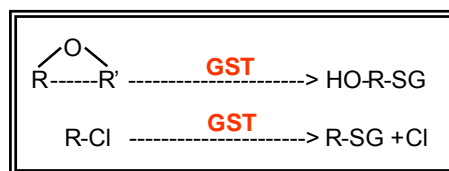


Abbildung 7: Schematische Übersicht der GST-katalysierten Reaktion

Der Abbau des GS-R-Konjugats erfolgt zunächst mit Hilfe der Glutamyltranspeptidase, die Glutamin abspaltet. Durch eine weitere Dipeptidase wird Glycin abgespalten, so daß nur noch ein Cysteinkonjugat vorliegt. Diese wird durch eine N-Acetyltransferase zur Mercaptursäure acetyliert, sodass ein in der Niere ausscheidbarer Metabolit entsteht (Marquard und Schäfer, 2003). Substrate der GSTs sind verschiedene Umwelttoxine (z.B. Benzo(a)pyren, Aflatoxin B-8-9-epoxid), Pestizide (z.B. Lindan), Medikamente (z.B. Menadione, Etacrynsäure) oder endogen gebildete Stoffe wie das Lipidperoxidaionsprodukt 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE), das wie viele der endogen aus der Lipidperoxidation entstehende Substrate bevorzugt von der GSTA4-4 entgiftet wird (Hayes und Pulford, 1995; Ketterer, 1998; Eaton und Bammler, 1999). Die im Kolon am stärksten exprimierte Isoform GSTP1 entgiftet die bei der DNA-Peroxidation entstehenden Basenpropenale (Ketterer, 1998). Auch wenn es sich bei der überwiegenden Mehrheit der GSH-Konjugate um Produkte mit einer geringeren Toxizität als das Ausgangsprodukt handelt, existieren einige instabile GSH-Konjugate, die zu einem toxischen Endprodukt oder aber zum Ausgangsprodukt, sei es über eine reversible Reaktion oder aber über eine Spaltung, führen (Hayes und Pulford, 1995). Insbesondere von der GSTT1 weiss man, dass sie abhängig vom Substrat auch zu einer Giftung des Substrates, wie im Falle von Dichlormethan zu dem kanzerogenen Formaldehyd führen kann (Hallier *et*

*al.*, 1994). Desweiteren können GSTs aber auch Peroxidaseaktivität aufweisen sowie sowohl eine über die L-site vermittelte nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion als auch eine Isomerisationsfunktion (Hayes und Pulford, 1995).

### 1.5.1.3 Induzierbarkeit und Regulation der GSTs

Regulation und Induzierbarkeit der GSTs sind das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels aus endogenen und exogenen Parametern. Diese beinhalten entwicklungs-, geschlechts- und gewebsspezifische Faktoren sowie eine große Zahl von Xenobiotika, welche die Induktion der GSTs beeinflussen können. Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation wurde zumeist an Tieren, insbesondere an Nagern, durchgeführt (Eaton und Bammler, 1999). Viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe zeichnen sich dadurch aus, dass sie GSTs induzieren können. Die Induktion der GSTs durch Antioxidantien/sekundäre Pflanzenstoffe als mechanistische Erklärung für den antikarzinogenen Effekt eines hohen Obst- und Gemüseverzehrs ist mehrfach beschrieben worden (Hayes und Pulford, 1995; Clapper und Szarka, 1998; Williamson *et al.*, 1998). Problematisch bei der Identifizierung der Regulationsmechanismen von GSTs ist, dass es hinsichtlich der Induzierbarkeit von GSTs bei Mensch und Tier unterschiedliche Induktionsmechanismen gibt. So konnte gezeigt werden, dass die Induktion des minimalen GSTY $\alpha$ -Promoters aus der Maus über die Bindung von AP-1 (c-jun/c-fos) an das ARE im Promoter erfolgt und durch Grüntee catechine und andere Antioxidantien induziert werden kann (Rushmore *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1997). Die GST-Aktivität in Mäusen konnte nach Verfütterung von Grüntee catechinen signifikant induziert werden (Khan *et al.*, 1992). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass der Promoter des Gens der GSTP1, der am besten untersuchten GST im menschlichen Kolon, keine ARE-Bindungsstelle, sondern neben einer NF $\kappa$ B-Bindungsstelle auch eine für AP-1 (TRE) besitzt (Abbildung 8) (Moffat *et al.*, 1994).

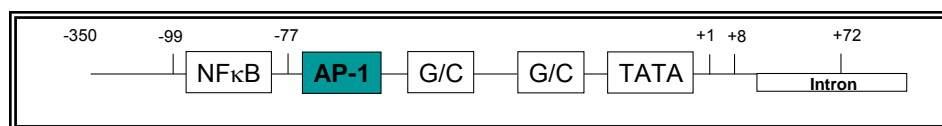


Abbildung 8: Struktur des Promoters der humanen GSTP1

(nach Xia *et al.*, 1996)

Die Regulation der GSTP1 erfolgt zelltypspezifisch. Ein weiterer Faktor der Transkriptionsregulation, der Methylierungsstatus des Promoters, ist ebenfalls abhängig von der Zellart. Borde-Chiché *et al.* zeigten, dass in K562 Leukämiezellen sowohl ein methyliertes als auch ein demethyliertes Allel des GSTP1 Promoters existiert, wohingegen der Promoter in Raji-Lymphom-Zellen gänzlich hypermethyliert vorlag (Borde-Chiche *et al.*, 2001). Der Promoter der GSTA4-4 besitzt eine AP-1-Bindungsstelle (Desmots *et al.*, 1998). Die Promoterregionen

von anderen GSTs, wie z.B. der GSTM oder GSTT sind noch nicht aufgeklärt. Der Promoter des murinen GSTM2 Gens, dessen Regulation über acht mutmaßliche Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors myb erfolgt, ist aber bereits bekannt (Kumar und Reddy, 2001).

## 1.5.2 Uridindiphosphatglukuronosyltransferasen (UGTs)

### 1.5.2.1 Einteilung, Familien, Nomenklatur

UGTs sind eine Familie von membran-gebundenen mikrosomalen Proteinen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Entgiftung und Eliminierung von endogen entstandenen und exogen zugeführten Substanzen, wie z.B. von Bilirubin, dem Abbauprodukt des Häm. Weitere Substanzen, zu deren Entgiftung UGTs beitragen können sind Drogen, Chemotherapeutika, Nahrungsmittelinhaltsstoffe und potentiell karzinogene Substanzen, z.B. das in der Nahrung vorkommende kanzerogene heterozyklische Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). Auf Sequenz-Alignment-Untersuchungen der zu erwartenden Aminosäure-sequenzen von geklonter RNA basierend wurden die UGTs in 2 Familien unterteilt, die UGT1 und die UGT2 (Burchell *et al.*, 1991). Der humane UGT1 Genlocus kodiert wenigstens 9 verschiedene Proteine. Im Gegensatz dazu werden die Gene der Familie UGT2 von einem einzigen Gen auf Chromosom 4 kodiert (Monaghan *et al.*, 1992). Im Menschen erfolgt die Expression der Genprodukte des UGT1A Locus gewebsspezifisch, wobei in der Literatur die extrahepatisch vorkommenden von den hepatisch vorkommenden UGT1s unterschieden werden (Strassburg *et al.*, 1998a). Die Proteine UGT1A7, UGT1A8 und UGT1A10 werden in hepatischen Geweben nicht exprimiert und es wurde gezeigt, dass diese drei Proteine in den gastrointestinalen Organen Speiseröhre, Magen, Dünndarm und Kolon unterschiedlich reguliert werden (Strassburg *et al.*, 1999b; Strassburg *et al.*, 2000).

### 1.5.2.2 Funktion der UGTs

UGTs katalysieren die Konjugation von Glukuronsäure auf lipophile Substrate und bewirken so deren Umwandlung in inaktivere hydrophobe Glukuronide, die renal oder bilär ausgeschieden werden können (Abbildung 9) (Strassburg *et al.*, 1998b).

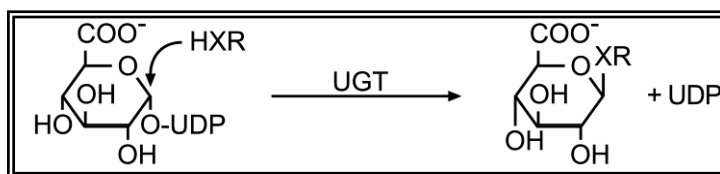


Abbildung 9: Schema der UGT-katalysierten Reaktion

Die Glukuronidierung ist einer der Hauptwege der Phase II Enzym-Reaktionen. Die UGT-vermittelte Glukuronidierung spielt eine wichtige Rolle in der Entgiftung von PhIP, dem heterozyklischen Amin, das am häufigsten in durchgebratenem Fleisch nachgewiesen wurde.

Der CYP1A2-vermittelte reaktive Metabolit von PhIP, das N-Hydroxy-PhIP (N-OH-PhIP), wird von den UGT-Isoformen 1A1, 1A6 und 1A9 effektiv glukuronidiert (Nowell *et al.*, 1999; Malfatti und Felton, 2001).

### 1.5.2.3 Induzierbarkeit und Regulation der UGTs

Es gibt einige Hinweise aus der Literatur darüber, dass Flavonoide als Induktoren der UGTs fungieren können. Galijatovic *et al.* zeigten in der intestinalen Zelllinie Caco-2, dass das Flavonoid Chrysin (u.a. aus *Passiflora coerulea*) sowohl die Expression des UGT-Isoenzyms 1A1 als auch die Gesamtaktivität der UGTs induzieren kann. Die erhöhte UGT-Aktivität in den Zellen resultierte in einem 10-fachen Anstieg der Glukuronidierungskapazität von N-OH-PhIP *in vitro* (Galijatovic *et al.*, 2001). Biochanin A, ein Flavonoid mit Estrogen-ähnlicher Wirkung, induzierte die UGT2B15-vermittelte Glukuronidierung von Testosteron in LNCAP, einer humanen Prostatazelllinie (Sun *et al.*, 1998). In humanen Hepatozyten führte die Behandlung mit Phenobarbital, Oltipraz und 3-Methylcholantren zur Induktion von UGT1A1 mRNA und Protein-Expression (Ritter *et al.*, 1999). Über die Regulationsmechanismen der UGTs ist bisher wenig bekannt. Aufgrund der differentiellen RNA-Expression der UGTs ist davon auszugehen, dass die Kontrolle der Regulation der UGTs gewebspezifisch verläuft. Zudem führt die differenzielle Regulation, die als Reaktion auf Stressoren beobachtet wurde, zu einer erhöhten Glukuronidierungskapazität (Yueh *et al.*, 2003). Die Regulation der humanen UGT1A1 erfolgt über einen konstitutiv aktiven Rezeptor, den steroidalen xenobiotischen Rezeptor (SXR), der auch als PXR (engl. pregnane X receptor) bezeichnet wird, sowie über das xenobiotische, responsive Element (XRE) (Xie *et al.*, 2003; Yueh *et al.*, 2003). Kürzlich konnte eine Dioxin-vermittelte Induktion der humanen UGT1A1 in Caco-2-Zellen über das XRE nachgewiesen werden (Munzel *et al.*, 2003).

## 1.6 Grüntee-assoziierte Krebsprävention

Die inhibierende Wirkung von Tee und Teeinhaltsstoffen gegenüber der Bildung von Krebserkrankungen in unterschiedlichen Geweben konnte an Tiermodellen hinreichend belegt werden (Yang und Wang, 1993; Katiyar und Mukhtar, 1997; Lu *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000). Die erste Publikation, die den Zusammenhang zwischen Teekonsum und Krebserkrankungen beim Menschen untersuchte, zeigte, dass Tee eine karzinogene Aktivität besitzt (Kaiser und Bartone, 1966) und auch heute ist der mögliche präventive Effekt von Tee gegen Krebs am Menschen noch nicht hinreichend belegt (Chen und Han, 2000).

### 1.6.1 Epidemiologische Datenlage

In zahlreichen, vorwiegend an Nagern durchgeführten, Tierversuchsstudien konnte gezeigt

werden, dass Zubereitungen aus Grüntee und Schwarztee die Tumorigenese verschiedener Organe (Haut, Lunge, Mundhöhle, Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Bauchspeicheldrüse, Brust) verhindern konnten. (Yang *et al.*, 2002). So konnte z.B. Katiyar *et al.* zeigen, dass die direkte Applikation eines Grünteeepolyphenolgemischs auf die Haut von Dimethylbenz[a]anthrazen-(DMBH) behandelten Mäusen zu einer Verringerung der Hautkrebsausbildung führt (Katiyar *et al.*, 1997). Obwohl Yang *et al.* kürzlich postulierten, dass die Wirkung von Tee in den verschiedenen Organen abhängig zu sein scheint vom Gehalt der Teeinhaltsstoffe, die das betroffene Gewebe erreicht (Yang *et al.*, 2002), ist die Wirkung von Grünteeapplikationen auf die Krebsprävention bzw. -behandlung im Kolon von Nagern widersprüchlich. In insgesamt vier an Ratten durchgeführten Studien wurde berichtet, dass die Behandlung mit Grüntee catechinen vor präneoplastischen Läsionen („Aberranten Crypt Foci“ (ACF)) bzw. Adenomen schützen konnte, die zuvor durch Azoxymethan (AOM), Dimethylhydrazin (DMH) oder durch N-hydroxylierte heterozyklische Amine induziert wurden (Yamane *et al.*, 1991; Dashwood *et al.*, 1999; Metz *et al.*, 2000; Jia und Han, 2001). In zwei weiteren Studien war die Anzahl der ACF durch die Behandlung mit Grüntee catechinen nicht reduziert (Challa *et al.*, 1997; Caderni *et al.*, 2000) und Hirose *et al.* konnte in einer an F344 –Ratten durchgeführten Studie zeigen, dass das Verfüttern von Grüntee catechinen zu einer Erhöhung der Anzahl von Kolonkarzinomen, die durch 2,2'-Dihydroxy-di-n-Propylnitrosamin (DHPN) induziert wurden, führte (Hirose *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie von Hirose wurden 1,2-Dimethylhydrazin (DMH)-vorbehandelten F344-Ratten Grüntee catechine von zwei verschiedenen japanischen Teeherstellern sowohl der Nahrung als auch dem Trinkwasser zugesetzt, verabreicht. Die Autoren beobachteten keinen chemopräventiven Effekt durch Grüntee catechine, sahen allerdings, dass die Größe der DMH-induzierten Kolontumoren durch die Zugabe von 0,1 % Grüntee catechinen im Trinkwasser zunahm (Hirose *et al.*, 2002). Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Krebserkrankungen des Menschen und dem Einfluss von Grüntee catechinen in der Chemoprävention hat der World Cancer Research Fund (WCRF) im Jahre 1997 lediglich einen möglichen Zusammenhang von Magenkrebs und Teekonsum postuliert. In vier von fünf Studien aus Japan und China konnte gezeigt werden, dass ein hoher Grüntee konsum mit einem verminderten Risiko für Magenkrebs assoziiert ist (AICR, 1997). In anderen epidemiologischen Studien konnte kein signifikanter Zusammenhang (Nagano *et al.*, 2001; Koizumi *et al.*, 2003) bzw. ein negativer Zusammenhang zwischen Grüntee konsum und Magenkrebs nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 1994; Jian *et al.*, 2004). Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen epidemiologischen Studien zum Zusammenhang von Tee konsum und Krebsentstehung resultiert aus der Wahl der untersuchten Gewebe und der unterschiedlichen Fragestellungen. Insbesondere

die Beurteilung der Wirkung von Grüntee in der Kolonkrebsprävention ist diffizil, da die wenigen bisher – ausschließlich im asiatischen Raum - durchgeführten epidemiologischen Studien zu inkonsistenten Ergebnissen führten (Bushman, 1998; Arab und Il'yasova, 2003; Borrelli *et al.*, 2004). So zeigte eine in Japan durchgeführte Studie von Kato *et al.*, dass der tägliche Konsum von Grüntee zu einem verminderten Risiko, an kolorektalen Adenomen und Kolonkrebs zu erkranken, führt; gleichzeitig war aber das Risiko an Rektalkrebs zu erkranken bei den Personen, die regelmäßig Tee tranken, höher im Vergleich zu den Nicht-Teetrinkern (OR: 1,32) (Kato *et al.*, 1990). Eine weitere, an Japanern durchgeführte prospektive Kohortenstudie von Nagano *et al.* zeigte allerdings keinen Effekt von Grüntee (Verzehr von mehr als 5 Tassen/Tag) hinsichtlich eines verminderten Krebsrisikos für Darm und Rektum (Nagano *et al.*, 2001). In einer dritten japanischen Kohortenstudie von Nakachi *et al.* konnte hingegen beobachtet werden, dass der Konsum von mehr als 10 Tassen Grüntee/Tag das relative Risiko, an Magen- oder Darmkrebs zu erkranken, deutlich senken konnte (OR Kolon/Rektum: 0,56) (Nakachi *et al.*, 2000).

### **1.6.2 Mechanismen der Grüntee-assoziierten Krebsprävention *in vitro***

Für die Hemmung der Karzinogenese durch Tee werden mehrere Mechanismen verantwortlich gemacht. Viele der bis heute verfügbaren Informationen stammen allerdings aus *in vitro* Studien, die mit Grüntee polyphenol-Konzentrationen (und hier speziell mit EGCG) arbeiteten, die fernab der physiologisch verfügbaren Dosen *in vivo* sind. Daher werden in diesem Rahmen nur Mechanismen vorgestellt, in denen der Bioverfügbarkeit von Teeinhaltsstoffen Rechnung getragen wurde.

### **1.6.3 Modulation von MAPK Kaskaden und AP-1-verwandter Aktivitäten**

In Zellmodellen konnten sowohl Grüntee catechine als auch EGCG die Aktivierung von MAPK Kaskaden als auch die des Transkriptionsfaktors AP-1 hemmen. Allerdings erfolgte eine Grüntee catechin-vermittelte Hemmung der MAP Kinasen- bzw. der AP-1-Aktivität eher, wenn vorher eine Induktion durch Zellstressoren erfolgte. So zeigte eine Vorbehandlung mit EGCG in epidermalen Keratinozyten (NHEK) nach Bestrahlung mit UVB Licht eine Hemmung der drei MAPK Kaskaden ERK, JNK und p38 sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, die aus der Bestrahlung mit UVB resultierte (Katiyar *et al.*, 2001). Lediglich in zwei Studien an humanen Zelllinien konnten bisher nachgewiesen werden, dass EGCG die konstitutive Aktivierung der MAPK ERK in Prostatazelllinien DU145 und LNCAP und in Fibrosarkomzellen hemmen kann (Maeda-Yamamoto *et al.*, 2003; Siddiqui *et al.*, 2004). Demgegenüber zeigte EGCG keinen Einfluss auf die Aktivierung der ERK in Keratinozyten (Balasubramanian *et al.*, 2002) und in allen anderen Studien führte eine Behandlung der



Zellen mit Grüntee catechinen bzw. EGCG zu einer Aktivierung der ERK (Yu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Bezüglich der MAPK JNK konnte in zwei Studien kein Einfluss von EGCG gezeigt werden (Balasubramanian *et al.*, 2002; Maeda-Yamamoto *et al.*, 2003), in allen anderen Studien führte eine Behandlung der Zellen mit Grüntee catechinen bzw. EGCG zur Aktivierung der JNK (Yu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

#### **1.6.4 Modulation des Transkriptionsfaktorkomplex Nukleärer Faktor $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)**

NF $\kappa$ B ist involviert in die Entzündungsreaktions-vermittelte Genexpression, die so u.a. das Überleben von Krebszellen fördert. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B beinhaltet die Phosphorylierung von I $\kappa$ B, das dann die Degradierung der NF $\kappa$ B nach sich zieht und es dem funktionalen p50/p65 Komplex erlaubt, in den Zellkern zu wandern, dort an die  $\kappa$ B Site im Promoter von Genen zu binden, um so die Transkription solcher Gene zu bewirken. Lin *et al.* konnten zeigen, dass EGCG in der Konzentration von 10  $\mu$ M die Degradierung von I $\kappa$ B und die Aktivierung von NF $\kappa$ B sowie die von Lipopolysacchariden induzierte NO-Synthase (iNOS) in Makrophagen verhindern kann (Lin *et al.*, 1999).

#### **1.6.5 Modulation der Apoptose**

Die EGCG-vermittelte Induktion der Apoptose wurde in Zelllinien aus Haut, Lunge, Magen, Prostata, Blut und Kolon vielfach beschrieben, wobei im Allgemeinen die für diesen Mechanismus verantwortlichen EGCG-Konzentration höher sind als die, die zu einer Wachstums-hemmung von Krebszelllinien führen (Yang *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wird auch eine prooxidative Aktivität von EGCG vermutet, die über die Bildung von oxidativem Stress zur Apoptose führt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Chen *et al.* zeigt, dass EGCG auch in der humanen Kolonzelllinie HT29 Apoptose induzieren kann. Die von Chen *et al.* untersuchten EGCG-Konzentrationen von bis zu 500  $\mu$ M sprechen aber für eine Stress-response als Antwort auf unphysiologische EGCG-Konzentrationen (Chen *et al.*, 2003). Ein differenziertes Bild lieferte die Arbeit von Weinreb *et al.*, die in neuronalen Zellen eine antiapoptotische Wirkung bei geringen EGCG Konzentrationen (1  $\mu$ M- 10  $\mu$ M) und eine proapoptotische in einem höheren Konzentrationsbereich (50  $\mu$ M- 500  $\mu$ M) feststellte (Weinreb *et al.*, 2003).

### 1.6.6 Modulation des Zellzyklus

Grüntee catechine können die Proliferation von kanzerogenen Zellen inhibieren sowie das Wachstum von Tumoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterdrücken. Ein Mechanismus ist der EGCG-vermittelte Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase der Zellen (Chen *et al.*, 2004). Ahn *et al.* beschrieben, dass der EGCG-vermittelte G1-Arrest in der Cervix-Krebszelllinie CaSki in Verbindung mit der gleichzeitig beobachteten Induktion der Apoptose stehen könnte (Ahn *et al.*, 2003). In einer anderen Studie belegten Lin *et al.* den EGCG-induzierten G1-Arrest an asynchronen MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie (Lin *et al.*, 1999). In verschiedenen Zellsystemen konnte außerdem gezeigt werden, dass die wachstumshemmende Wirkung von EGCG auf kanzerogene Zellen beschränkt ist (Chen *et al.*, 1998; Wang und Bachrach, 2002; Chung *et al.*, 2003; Mittal *et al.*, 2004).

### 1.6.7 Interaktion von Grüntee catechinen mit Oberflächenrezeptoren

EGCG ist in der Lage, an den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) zu binden und so die Bindung von EGF an den Rezeptor (EGFR) zu unterdrücken (Liang *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2002; Sah *et al.*, 2003). Tachibana *et al.* entdeckten kürzlich einen Rezeptor für EGCG. Bei diesem handelt es sich um den 67 kD großen Laminin-Rezeptor, der in vielen Tumorgeweben überexprimiert wird. Die Autoren konnten zeigen, dass es durch die Behandlung mit EGCG von Zellen, die mit diesem Laminin-Rezeptor transfiziert waren, zu einer deutlichen Wachstumsreduktion kam, und zwar bereits bei sehr geringen EGCG-Konzentrationen von 0,1 sowie 1  $\mu$ M (Tachibana *et al.*, 2004)

## 2 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Sowohl die aus Tierversuchsstudien als auch die aus epidemiologischen Studien erhaltenen Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Grünteekonsum und Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes sind widersprüchlich. Kürzlich erschienene Studien zeigten, dass die Zugabe von Grünteeinhaltsstoffen zum Trinkwasser sogar die Anzahl und die Größe von Kolonkarzinomen in Ratten induzierte. Da Kolonkrebs schon heute an zweiter Stelle der Krebstodesursachen in Deutschland steht, auf der anderen Seite die Beliebtheit des Getränks Grüntee und der damit verbundene Verzehr von funktionellen Lebensmitteln, denen Grünteeinhaltsstoffen, insbesondere Grüntee catechine zugesetzt werden, stetig zunimmt, ist die Untersuchung von dieser Stoffe zur Beurteilung von Grüntee in der Prävention von Krebserkrankungen notwendig. Da insbesondere der Gastrointestinaltrakt nach Konsum von Tee höheren Mengen der Grüntee catechine ausgesetzt ist als nach der Resorption im Plasma gefunden werden, ist es denkbar, dass diese Inhaltsstoffe wirkungsvolle Substanzen in der Prävention von Darmkrebserkrankungen sein können. Ein diskutierter Mechanismus in der Krebsprävention ist die Hemmung des Wachstums von Krebszellen, als ein weiterer Mechanismus wird die Induktion von Entgiftungsenzymen in der Zelle angesehen. Beiden Mechanismen liegt die Beteiligung von Signaltransduktionsmolekülen der Familie der MAP Kinasen sowie des Transkriptionsfaktors AP-1 zugrunde. Auch wenn aus der Literatur bereits zahlreiche Hinweise zur Wirkung von Grüntee catechinen auf MAP Kinasen und AP-1 bekannt sind, besteht hinsichtlich ihrer Wirkung im Kolongewebe weiterer Klärungsbedarf, da in vielen Studien demonstriert wurde, dass die Effekte von Grüntee catechinen Gewebe- bzw. Zelltyp-abhängig sind. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden an der humanen Kolontumorzelllinie HT29 und zum Vergleich der Substanzwirkung in weniger transformierten Zellen am differenzierten Klon HT29 clone 19a sowie an der Adenomzelllinie LT97, die als Modell eines frühen Stadiums der Kolonkarzinogenese angesehen werden kann, durchgeführt.

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

### **1.) Können Grüntee catechine die Rezeptor-Liganden-Interaktion von Kolonzelllinien sowie nachgeschaltete Signalkaskaden der MAP-Kinasen-Familie beeinflussen?**

In dieser Arbeit sollte daher

- \* überprüft werden, ob die Wirkung von Grüntee catechinen in Kolonzelllinien über Oberflächenrezeptoren erfolgt.
- \* verglichen werden, inwieweit sich die Wirkung eines komplexen GTE von der Wirkung einzelner Grüntee catechine unterscheidet.

- \* verglichen werden, ob sich die untersuchten Kolonzelllinien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Grüntee catechinen bzw. EGF unterscheiden
- \* bestimmt werden, ob ein komplexes Grüntee polyphenolgemisch bzw. EGCG zur Aktivierung der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 in Kolonzelllinien führt

## **2.) Welche Wirkung üben Grüntee catechinen bzw. EGCG auf den Transkriptionsfaktor AP-1 aus?**

In der vorliegenden Arbeit sollte

- \* die Expression der AP-1-Untereinheiten *c-jun* und *c-fos* nach Behandlung von Kolonzellen mit Grüntee catechinen bzw. EGCG bestimmt werden.
- \* die Bindungsaktivität von verschiedenen AP-1-Untereinheiten an die TRE-Bindungsstelle gemessen werden und die Frage geklärt werden, inwieweit Grüntee catechine diese Bindungsaktivität verändern können.
- \* die Grüntee catechin-vermittelte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 mit Hilfe eines Reporter-Gen-Assay erfasst werden.

## **3.) Führt die Behandlung von Kolonzellen mit Grüntee catechinen zu einer differentiellen Expression von Genen, die an Metabolisierung und Entgiftung beteiligt sind?**

Zu diesem Zweck sollte

- \* eine cDNA-Array-Technik sowie deren Auswertungsverfahren etabliert werden, die es ermöglichen sollte, die Expression von Fremdstoffmetabolismus-assoziierten Genen zu screenen.
- \* untersucht werden, ob und wie sich stark und schwach transformierte Kolonzellen hinsichtlich der Genexpression von Metabolismus-relevanten Genen unterscheiden.
- \* der Effekt einer dosisabhängigen Grüntee catechin-Behandlung auf die Genexpression von Fremdstoffmetabolismus-assoziierten Genen in Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsstadiums bestimmt werden.
- \* die Verifizierung der cDNA-Array-Ergebnisse anhand ausgewählter Zielgene erfolgen.

**4.) Hat die Behandlung von Kolonzelllinien unterschiedlichen Transformationsgrades mit Grüntee catechinen bzw. EGCG einen Einfluss auf das Zellwachstum?**

In dieser Arbeit sollte daher

- \* die Bestimmung verschiedener Parameter zur Messung der Proliferation von Kolonzellen erfolgen (DNA-Gehalt, DNA-Synthese, Gesamtzellzahl).
- \* verglichen werden, wie sich GTE und EGCG in der Wirkung auf das Zellwachstum von Kolonzelllinien unterscheiden.
- \* der Einfluss von FCS im Kulturmedium während der Substanzinkubation der Zellen geklärt werden.

Aus den gewonnenen Ergebnissen sollte hervorgehen, ob durch eine Behandlung mit Grüntee catechinen AP-1-relevante Signalwege in humanen Kolonzelllinien beschriftet werden und welche funktionellen Konsequenzen durch die Behandlung mit Grüntee catechinen erwartet werden können, um die Wirkung von Grüntee catechinen in der Kolonkrebsprävention besser beurteilen zu können.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Fisher Scientific, Schwerte
Glycerin	Fisher Scientific, Schwerte
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Nusieve 3:1	Biozym Diagnostics, Hameln
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Biotinfreies Milchpulver	BioRad, München
N, N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Rinderserum-Albumin (BSA)	Life Technologies, Karlsruhe
Rotiphorese Monomer (30 %/ 0,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trizol Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe

##### 3.1.2 Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen

AP-Streptavidin gekoppelt	SuperArray Inc.
Anti-Active®JNK for activated JNK	Promega, Mannheim
Anti-ACTIVE®p38 for activated p38	Promega, Mannheim
Anti-p44/p42 Antikörper	NewEngland Biolabs
Anti-DIG-AP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP Mix	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
dATP	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
dTTP	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Dgtp	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
dCTP	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Lachsspermien-DNA	Life Technologies, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Life Technologies, Karlsruhe
Pefabloc SC	Carl Roth, Karlsruhe
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe
CDP-Star	Roche Diagnostics, Mannheim
NBT/BCIP	Roche Diagnostics, Mannheim
MMRV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-ACTIVE® MAPK for activated ERK1/2	Promega, Mannheim

**3.1.3 Kits**

ECF Enhanced Chemiluminescence Kit  
 Nuclear Cell Extraction Kit  
 DIG RNA Labeling Kit  
 TransAM AP-1 Family Kit  
 RNeasy Mini Kits  
 Superscript One step RT PCR Kit  
 Mercury™ Pathway Profiling SEAP System  
 BrdU Kit  
 VenorGem Kit  
 LPR Ampolabeling Kit  
 GEArray Q series Human Drug Metabolism Kit

Amersham Pharmacia, Freiburg  
 Active Motif, Rixensaart, Belgien  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Active Motif, Rixensaart, Belgien  
 Qiagen, Hilden  
 Life Technologies, Karlsruhe  
 BD Biosciences Clontech, Heidelberg  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Minerva Biolabs, Berlin  
 Superarray, Fredereick, USA  
 Superarray, Fredereick, USA

**3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze**

DMEM  
 EGF  
 FCS  
 HGF  
 Insulin  
 L-Glutamin (Konz.)  
 MCDB Medium  
 Penicillin/Streptomycin (je 10 000 U/ml)  
 Transferrin  
 Triiodthyronin  
 Versene

Life Technologies, Karlsruhe  
 Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden  
 Life Technologies, Karlsruhe  
 Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden  
 Life Technologies, Karlsruhe  
 Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden  
 Biochrom, Berlin  
 Life Technologies, Karlsruhe  
 Life Technologies, Karlsruhe  
 MP Biomedicals, Eschwege  
 Life Technologies, Karlsruhe

**3.1.5 DNA- und Proteinstandards**

Rainbow Broad Range Proteinstandard  
 DNA 100 bp Längenstandard  
 6 x DNA-Ladepuffer

Amersham Pharmacia, Freiburg  
 PeqLab Biotechnologie, Erlangen  
 PeqLab Biotechnologie, Erlangen

**3.1.6 Membranen**

Hybond® Positiv geladene Nylonmembran  
 Polyvinylidenfluorid Membran

Roche Diagnostics, Mannheim  
 Schleicher & Schüll, Dassel

**3.1.7 Filmmaterial**

Roentogen liquid Entwickler  
 Roentogen Superfix Fixierer  
 Hyperfilm

Röntgenversand Wurzbacher, Erfurt  
 Röntgenversand Wurzbacher, Erfurt  
 Amersham Pharmacia, Freiburg

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Kultivierung von LT97 Zellen**

Die permanente Zelllinie LT97 stammt ursprünglich aus einem humanen Colon Mikroadenom und wurde uns von Frau Prof. Marian (Wien) zur Verfügung gestellt (Richter *et al.*, 2002). Die Zellen werden in LT97 Wachstumsmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2 Tage wird das Medium gewechselt, beim Erreichen von 70 – 80 % Konfluenz werden die Zellen passagiert. Dafür wird das Medium entfernt und die Zellen werden kurz mit PBS/NaEDTA (5 mM) gewaschen, das PBS/EDTA wird bis auf 0,5 - 1,5 ml (je nach Flaschengröße) wieder abgesaugt, so daß ein Flüssigkeitsfilm erhalten bleibt. Nach maximal 5 Minuten werden die Zellaggregate durch Klopfen am Flaschenboden gelöst und in ca. 5 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wird in dem gewünschten Volumen Wachstumsmedium aufgenommen und ausgesät. Die regelmäßige Kontrolle der Zellkultur zum Ausschluss einer Kontamination mit Mykoplasmen erfolgte mit einem Mykoplasmen-DNA-Amplifikationstest auf Basis einer PCR (VenorGem Kit, Minerva Biolabs).

#### **3.2.1.2 Kultivierung von HT29-Zellen und HT29 clone 19 a Zellen**

Die permanente Zelllinie HT29 stammt aus einem humanen Kolongewebe mit Adenokarzinom und wurde 1975 von von Kleist etabliert (von Kleist *et al.*, 1975). Die HT29 clone 19 a Zellen wurden durch die Behandlung der HT29 Zellen mit Butyrat etabliert (Augerin und Laboisie, 1984). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärente Monolayer. Die Generationszeiten betragen 12 h (HT29) sowie 24 h (HT29 clone 19 a) [T.W. Becker, unveröffentlichte Ergebnisse). Beide Zelllinien werden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep (jeweils 50 U/ml) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und bei Erreichen von 80-95 % Konfluenz passagiert. Dafür wird das alte Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml Trypsin/Versen (1 x) abtrypsiniert und die so erhaltene Zellsuspension entsprechend des Ausaatprotokolls geteilt und in eine neue Zellkulturflasche (25 bzw. 75 cm<sup>2</sup>) mit frischem Medium gebracht. Die regelmäßige Kontrolle der Zellkultur zum Ausschluss einer Kontamination mit Mykoplasmen erfolgte mit einem Mykoplasmen-DNA-Amplifikationstest auf Basis einer PCR.

### **3.2.2 Testsubstanzen**

In Tabelle 3 ist die Herstellung der in der Arbeit verwendeten Stammlösungen der Testsubstanzen dargestellt.



Tabelle 3: Herstellung der in der Arbeit verwendeten Testsubstanzen

SUBSTANZ (LAGERUNGSTEMPERATUR)	KONZENTRATION DER STAMMLÖSUNG	HERSTELLUNG
GTE (-20 °C)	21,4 mM EGCG- Äquivalente	0,1 g + 900 µl Aqua bidest (steril) 30 sec vortexen, 5 min im Ultraschallbad lösen, Überstand 2x10 min bei RT mit 4000 g und 16000 g abzentrifugieren, steril filtrieren, frisch hergestellt
(-)-EGCG (4 °C, dunkel)	20 mM	50 mg in 5,45 ml Aqua bidest (steril), 60sec vortexen, steril filtrieren, max. 6 Wochen verwendet
(-)-EGCG (4 °C, dunkel)	128,4 mM	5 mg in 85 µl Aqua bidest (steril)
(+)-EC (4 °C, dunkel)	76,2 mM	1 mg in 45,2 µl Aqua bidest (steril)
(-)-ECG (4 °C, dunkel)	53,7 mM	1 mg in 42,1 µl Aqua bidest (steril)
(-)-EGC (4 °C, dunkel)	137,4 mM	1 mg in 23,8 µl Aqua bidest (steril)
Gallussäure (4 °C, dunkel)	29 mM	1 mg in 183,2 µl Aqua bidest (steril)
(+)-Catechin (4 °C, dunkel)	39 mM	1 mg in 88,3 µl Aqua bidest (steril)
GTEsyn	21,4 mM EGCG- Äquivalente	Je 1 µl der oben aufgeführten Stammlösungen (grau hinterlegt) folgender Substanzen: EGCG, EC, ECG, EGC, Catechin und Gallussäure als Gemisch

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl vitaler Zellen erfolgte mittels Trypanblau, das in tote Zellen eindringen kann, von lebenden aber ausgeschlossen wird. Die vitalen Zellen sind ungefärbt, die toten Zellen färben sich blau. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die nicht blau erscheinenden Zellen unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich nach Auszählung von 4 Großquadraten mit Hilfe folgender Formel:

Anzahl der gezählten Zellen/Anzahl der gezählten Großquadrate x Verdünnung x  $10^4$  = Zellzahl pro Milliliter

Vitalität [%] = (Anzahl vitaler Zellen/Gesamtzellzahl)\*100

### 3.2.4 Zytosensor Mikrophysiometrie

Das Zytosensor-Mikrophysiometrie-System erfasst die zelluläre Antwort auf eine große Zahl unterschiedlicher Wirkstoffe, indem die Ansäuerung des die Zellen umgebenden Mediums mit Hilfe eines aus Silizium bestehenden Sensors gemessen wird (McConnell *et al.*, 1992). Im zellulären Stoffwechsel werden Protonen in erster Linie durch die Bildung von Milchsäure während der Glykolyse und durch die Bildung von CO<sub>2</sub> während der Atmung, das als

$\text{HCO}_3^-$ , die Zelle verlässt, produziert; in der Gewebekultur ist Glukose die bevorzugte Quelle der Glykolyse, wohingegen Pyruvat und Glutamat die Kohlenstoff-Quellen der Atmung sind (Abbildung 10). Laktat und  $\text{CO}_2$  diffundieren passiv durch die Zellmembran oder werden aktiv über Säure- und Anionentransporter aus der Zelle geschleust. Darüberhinaus werden  $\text{H}^+$ -Ionen über Austauscher, Kanäle oder Pumpen, die sich in der Zellmembran befinden, ausgestoßen. Der Energiestoffwechsel der Zelle reguliert sich hauptsächlich über die Bereitstellung und den Verbrauch von ATP. Wird ein Oberflächenrezeptor der Zelle aktiviert, kann sich dies in gesteigertem oder vermindertem ATP-Verbrauch zeigen, was wiederum eine Änderung in der Geschwindigkeit, mit der sich die Glykolyse und/oder die Atmung vollziehen, zur Folge hat.

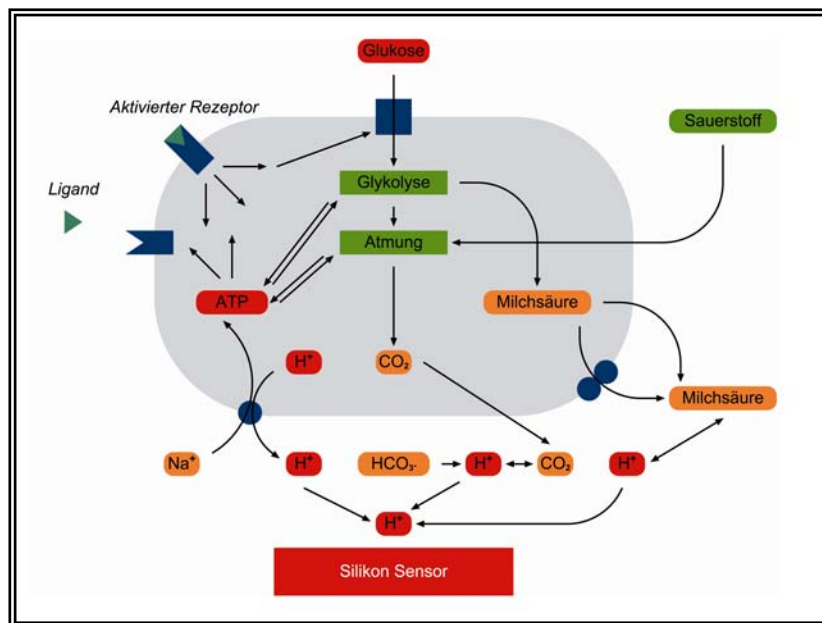


Abbildung 10: Schema der metabolischen Prozesse, die mittels Zytosensor-Mikrophysiometrie erfasst werden

(modifiziert nach McConnell et al., 1992)

Der Zytosensor ist somit ein System zur schnellen Messung der Aktivierung von Oberflächenrezeptoren. Die Aktivierung vieler Rezeptorklassen resultiert in der Weitergabe intrazellulärer Signale durch verschiedene „second messenger“-Wege und eine physiologische Konsequenz der Rezeptoraktivierung ist die Exkretion säurehaltiger Produkte aus der Zelle. Der Zytosensor misst die Fähigkeit der Zellen zur pH-Wert-Änderung ihres sie umgebenden Mediums. Diese Abweichung wird durch das Zytosensor-System als eine Signaländerung aufgezeichnet, die mit der basalen Ansäuerungsrate (AR) der Zelle verglichen werden kann und ein Maß für die Veränderung der metabolischen Aktivität der Zellen darstellt. Die Aussaat der Zellen (300.000 Zellen /well) erfolgte 48 h vor Versuchsbeginn auf Membraneinsätze, die in 12-well-Platten eingesetzt waren. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM, dem L-Glutamin und NaCl zugesetzt waren. Der Cytosensor wurde 24 h vor Ver-

suchsbeginn nach Anleitung des Herstellers desinfiziert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Zellen zwischen zwei poröse Membranen in der Messkammer eingebettet, kalibriert und mindestens 1 h von einer kontrollierten Menge an Medium durchflossen. Anschließend erfolgte der Wechsel auf Medium, dem die Testsubstanzen zugesetzt waren.

### **3.2.5 Proliferationstests**

#### **3.2.5.1 DNA-Färbung mit DAPI**

Dieser Test zur Bestimmung des DNA-Gehalts als Maß für die Zellzahl beruht auf der irreversiblen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI) an DNA. Nach Aussaat der Zellen in Mikrotiterplatten werden die Zellen für 48 h vorinkubiert, bevor die Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz erfolgt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wird die DNA der Zellen durch Methanol am Boden der Mikrotiterplatten fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt. Diese Färbung ist nach 30 min stabil und die Fluoreszenz wird photometrisch an einem Plattenreader bei Ex/Em 360/465 nm gemessen. Die emittierte Fluoreszenz ist direkt proportional zur DNA-Menge im well.

#### **3.2.5.2 Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in Mikrotiterplatten**

Ein wesentlicher Schritt in der Zellteilung ist die Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase der Mitose. Aus diesem Grund wird die DNA-Syntheserate direkt mit dem Proliferationsverhalten der Zellpopulation in Verbindung gebracht. Der Einfluss auf die Proliferation wurde mit dem Cell-Proliferation-ELISA BrdU (kolorimetrisch) untersucht. Dabei wird 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) statt Thymidin in die DNA eingebaut und nach Fixierung der Zellen durch einen Antikörper detektiert (Porstmann *et al.*, 1985; Magaud *et al.*, 1988). Der Test stellt eine gute Alternative zur Bestimmung des  $^3\text{H}$  Thymidineinbaus dar (Muir *et al.*, 1990). Die Präparation erfolgte nach dem Standardprotokoll des Kits (wissenschaftliche Begleitinformation, Roche Diagnostics). Die Bestimmung der DNA-Syntheserate erfolgte in 96-er Multikavitätsplatte, 24 h und 48 h nach GTE- bzw. EGCG-Exposition.

#### **3.2.5.3 Zellzahlbestimmung**

Neben einer Aussage zur Vitalität von Zellen kann die Trypanblau-Färbung (siehe 3.2.3) auch genutzt werden, um die Gesamtzellzahl zu bestimmen.

### **3.2.6 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.6.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen**

Nach Aussaat der Zellen und Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgte die Zugabe von SDS-PAGE-Ladepuffer. Die Zellen wurden kurz bei RT lysiert, mit einem sterilen Gummiwischer sorgfältig vom Boden der Zellkulturflasche abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß

überführt. Nach der Aufbereitung aller Proben erfolgte die Denaturierung der Proben für 5 min bei 95 °C; daran schloss sich ein 5-minütiges Ultraschallbad an. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### **3.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford (modifiziert für Western Blot)**

Proteinkonzentrationen können einfach, schnell und auch sensitiv (Nachweisgrenze: 5 µg/ml) mit der von Bradford beschriebenen Methode bestimmt werden (Bradford, 1976). Sie beruht darauf, daß sich das Nachweisreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250 kovalent an die Sulfhydrylgruppen der Proteine bindet, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Dabei ist die Menge des entstehenden Farbkomplexes proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Die Zelllysate werden im Verhältnis 1 zu 10 mit PBS verdünnt. Für die Kalibrierungskurve werden BSA-Lösungen der Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml angesetzt. Je well der 96-well-Mikrotiterplatte werden 20 µl Probe bzw. 20 µl PBS (für den Nullabgleich) bzw. 20 µl der BSA-Eichlösung und 180 µl Bradford Reagenz pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln erfolgt die photometrische Messung bei 620 nm. Anhand der Kalibrierungskurve werden dann die Proteinkonzentrationen der Zellysate berechnet.

#### **3.2.6.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse wurde ein von Lämmli entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet (Lämmli, 1970). Dazu werden die Proben in Probenpuffer aufgenommen. Die Spaltung von Disulfidbrücken durch DTT verhindert eine Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten zu multimeren Proteinen. SDS, ein anionisches, hydrophiles Detergenz, denaturiert die Proteine und verleiht ihnen durch Anlagerung an ihre Oberfläche eine negative Ladung. Dadurch können die Proteine nahezu unabhängig von ihrer eigentlichen Ladung und Faltung entsprechend ihrer Molmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einem Puffer aus 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin und 0,05 % (w/v) SDS durchgeführt. Zur Konzentrierung der Proteine bei einer Spannung von 170 V diente ein relativ großporiges Sammelgel (4 %), während die Auftrennung bei gleicher Voltzahl in einem kleinporigen Trenngel (12 %) erfolgte.

#### **3.2.6.4 Immunoblotting**

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (4.4.3) wurden durch das Immunoblotting nach Towbin et al. auf PVDF-Membranen übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Towbin *et al.*, 1979). Der Proteintransfer (Minigel, 8 x 10 cm) erfolgte

für 90 Minuten bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> mit Blottingpuffer. Die PVDF-Membran wurde anschließend mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff dann durch Spülen mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht. Um den Proteinen später eine Molmasse zuordnen zu können, wurde die Position der Standardproteine auf den Membranen markiert. Dann wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 1 h in einer 5 %-igen Lösung von Milchpulver in TBS/T geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß daran folgte eine Inkubation über Nacht mit Antiseren (Verdünnungen 1:150 - 1:5000), die gegen bestimmte Peptidsequenzen der nachzuweisenden Proteine gerichtet waren. Nach mehrmaligem Waschen der PVDF-Membranen mit TBS/T-Puffer wurden diese für 1 h mit einer 1:600 verdünnten Fluorescein-konjugierten Anti-Immunglobulin-Antikörper-Lösung inkubiert (Anti-Maus-IgG bzw. Anti-Kaninchen-IgG). Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen für 1 h mit einem 1:1000 verdünnten AP konjugierten Anti-Fluorescein inkubiert. Im Anschluss daran wurde mehrmals mit TBS/T-Puffer gewaschen und die Peroxidase-Aktivität durch verstärkte Chemilumineszenz nachgewiesen (ECF-Kit, Amersham, Braunschweig):

#### **3.2.6.5 Stripping von Membranen**

Bereits im Western Blot eingesetzte Membranen können erneut mit anderen Antikörpern entwickelt werden, nachdem die zuvor benutzten Antikörper entfernt wurden bzw. die Membran „gestripped“ wurde. Häufig wird diese Methode auch eingesetzt, um nach Analyse des Phosphorylierungsstatus eines Proteins gleiche Mengen des Proteins in allen Ansätzen zu belegen. Der Nachteil der Methode besteht in einem teilweisen Verlust membrangebundener Proteine (nicht nur des zu entfernenden Antikörpers) und einer Zunahme der unspezifischen Bindung, des Hintergrunds. Nach der ECF-Entwicklung wird die Membran kurz mit TBS/T zur Entfernung noch verbliebener ECF-Reagentien gewaschen und 30 Minuten bei 56 °C im Hybridisierungs-Ofen in einer geschlossenen Röhrenflasche mit „Stripping“-Puffer inkubiert. Danach wird mindestens zweimal 15 Minuten mit TBS/T gewaschen, um überschüssiges  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) zu entfernen, bevor wieder mit 5 % Milchpulver in TBS/T unspezifische Bindung blockiert und der Blot nach dem unter 3.5.4. beschriebenen Vorgehen mit erstem, zweitem und drittem Antikörper erneut entwickelt wird.

#### **3.2.6.6 Auswertung und Dokumentation der Western Blots**

Die quantitative Auswertung der Proteinbanden erfolgt densitometrisch an einem Geldokumentationssystem (Fluor S, BioRad, München) mit Hilfe der Software QUANTITY ONE (BioRad, München). Anhand des „Band Analysis Quick Guide“ wurde die Intensität jeder

Bande (Pixeldichte) bestimmt. Soweit die Banden für phosphorylierte MAP Kinasen detektierbar waren, erfolgte die Herausrechnung des Protein-Auftragsfehlers durch die Bildung des Quotienten mit der jeweiligen Bande der Gesamt-ERK.

Da eine statistische Auswertung durch das teilweise Fehlen der Kontrollbanden nicht möglich war, wurde die Induktion entsprechend des Wertes des Quotienten festgelegt (Tabelle 4).

*Tabelle 4: Festlegung zur Quantifizierung der MAP Kinasen Aktivität*

STÄRKE DER INDUKTION	WERT DES QUOTIENTEN
Leicht	Zwischen 0,3 und 0,49
Mittel	Zwischen 0,5 und 0,74
Stark	Größer 0,75

### **3.2.7 Molekularbiologische Grundtechniken**

#### **3.2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen mit TriZol Reagenz**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellkulturen, die im Northern Blot eingesetzt wurde, erfolgte mit TriZol<sup>®</sup> Reagenz. Mit dieser Reagenz, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, ist die Isolierung der Gesamt-RNA einer Zellen modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) möglich.

#### **3.2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellkulturen, die zur Durchführung der cDNA-Arrays (siehe 3.2.12) eingesetzt wurde, erfolgte mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (RNEasy Mini Kits, Quiagen, Hilden).

#### **3.2.7.3 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes**

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte im UV-Spektrophotometer und beruht auf der spezifischen Absorption der Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Dabei entspricht die OD-Einheit [260 nm] einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus A260/A280 gibt einen Hinweis auf den Reinheitsgehalt der RNA und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Für jede RNA-Probe wurde eine Doppelbestimmung (1:100 Verdünnung mit DMPC-Wasser bzw. RNase freiem Wasser) durchgeführt und die Werte im Anschluss gemittelt.

#### **3.2.7.4 Herstellung der cRNA-Sonden mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Die im Northern Blot eingesetzten Hybridisierungssonden (cRNA) wurden mittels RT-PCR hergestellt, der eine *in vitro*-Transkription mit gleichzeitigem Einbau von Digoxigenin-markierten UTP mit Hilfe der T7 RNA Polymerase folgte. Die RT-PCR erfolgte als so-

nannte One-Step-RT-PCR unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits mit genspezifischen Oligonukleotid-Primern. Dabei wurde mit einem reverse Primer gearbeitet, der neben dem Primer für das jeweils zu amplifizierenden Gen (*GAPDH*, *c-jun*, *c-fos*) auch die Sequenz des T7-RNA Polymerase Promoters enthielt (siehe Tabelle 15, Anhang II). Pro Gen wurden jeweils 5 Ansätze und jeweils 1 Negativkontrolle nach dem Schema aus Tabelle 5 unter den in Tabelle 6 gezeigten Bedingungen in 36 Zyklen amplifiziert und anschließend im 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt, um die Qualität des PCR-Produktes beurteilen zu können.

*Tabelle 5: Schema RT-PCR-Ansatz*

	NEGATIVKONTROLLE	RT-PCR-ANSATZ
Gesamt-RNA		0,5 µg
DMPC-H <sub>2</sub> O	1 µl	
2x Reaction Mix	25 µl	25 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl	1 µl
T7-Primer reward (10 µM)	1 µl	1 µl
RT/Taq Mix	1 µl	1 µl
DMPC-H <sub>2</sub> O	Ad 50 µl	Ad 50 µl

*Tabelle 6: PCR-Bedingungen der in-vitro-Transkription*

SCHRITT	BEDINGUNG	REAKTION
1	30 min, 50 °C	Reverse Transkription
2	2 min, 90 °C	Denaturierung
3	30 sec, 90 °C	Denaturierung
4	30 sec, 57 °C	Annealing/Hybridisierung
5	30 sec, 72 °C	Extension
6	10 min, 72 °C	Finale Extension
7	∞, 4 °C	Kühlung

Für die Herstellung der DIG-markierten RNA-Sonde zur Identifikation der GSTP1 wurde ein im Labor existierendes linearisiertes und aufgereinigtes Plasmid verwendet, das neben der Promoter-Sequenz der T7-RNA-Polymerase ein 725 bp großes GSTP1-cDNA-Fragment enthielt. Dieses Plasmid konnte als Matritze analog dem bereits beschriebenen Verfahren eingesetzt werden.

### 3.2.7.5 Auftrennung der RNA im Agarose-Gel

Treten die unter 3.2.7.3 beschriebenen Unreinheiten auf, wird die RNA vor Auftrennung im Agarose-Gel gefällt. Dazu wird zu der RNA entsprechend der Ausgangsmenge 1/10 Lithiumchlorid (4 M, pH 5,2) gegeben. Dann wird das RNA/Natriumacetat-Gemisch mit der 2,5 fachen Menge EtOH (75 % in DMPC-Wasser) versetzt und gevortext. Nach einer Stunde bei –20 °C wird die Probe 20 min bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in

der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 40 µl DMPC-Wasser aufgenommen. Nach einem Einfrierschritt (mind. 1 h bei -20 °C) wurde erneut die Konzentration der RNA bestimmt. RNA muss in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt werden, um eine zu starke Aufknäulung der RNA zu verhindern. Zur Denaturierung werden Formamid und Formaldehyd verwendet. Die in Auftragspuffer aufgenommene RNA wurde 20 min bei 70 °C im Thermomixer (Eppendorf) denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis aufbewahrt. Als Gel wurde ein 1,5 % MOPS-Agarose-Gel verwendet. Das Gel wird mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer überschichtet und die vorbereiteten Proben werden eingefüllt. Die Laufzeit beträgt 3 h bei 5 V/cm angelegter Spannung. Anschließend wird das Gel im ImageAnalyzer fotografiert und mind. 20 min in 20 x SSC äquilibriert, um Formaldehyd und Formamid auszuwaschen. Bei der Elektrophorese wird die Polarität der RNA ausgenutzt. Da die Phosphatgruppen der RNA als Protonendonatoren dienen, ist RNA negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert sie daher in Richtung Anode. Je höherprozentig das Gel ist, desto langsamer wandert die RNA und desto stärker werden die einzelnen Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt. Große Fragmente laufen aufgrund ihres höheren Molekulargewichts und ihrer größeren Unbeweglichkeit weniger weit als kleine Fragmente. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist auch abhängig von der Spannung zwischen den beiden Polen. Je höher die Spannung, desto schneller läuft das Gel.

### **3.2.7.6 Blotting**

Beim Northern Blot-Verfahren wird die RNA aus dem Gel auf eine Membran übertragen, wo sie fixiert werden kann. Unterschiedliche Membranen sind für die verschiedensten Zwecke entwickelt worden. Der Vorteil der hier verwendeten Nylonmembran liegt in der großen Stabilität, die eine mehrfache Hybridisierung möglich macht. Die positiv geladene Membran in 20 x SSC-Puffer äquilibriert, bevor sie auf einer festen Unterlage aus Filterpapier gelegt wird. Auf die Membran wird das Gel gelegt. Anschließend legt man eine Salzbrücke, ein Stück mit 20 x SSC durchtränktes Filterpapier auf, dessen beide Enden in 20 x SSC schwimmen. Durch die wirkenden Kapillarkräfte wird die RNA so vom Gel auf die Membran transferiert. Der Blot wird mit Folie verpackt und anschließend mit 1 kg Gewicht beschwert. Das Blotting findet über Nacht statt. Anschließend wird das Gel von der Membran abgenommen und auf dem UV-Schirm kontrolliert. Danach erfolgt die Fixierung („cross linking“) der RNA-Fragmente auf der Membran für 20 min im Ofen bei 120 °C oder alternativ für 2 min auf einem UV-Tisch.



### 3.2.7.7 Hybridisierung

Hybridisierungen von Nukleinsäuren beruhen auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin. Aus einer vorliegenden Sequenz kann daher immer der entsprechende Gegenstrang ermittelt werden. Bei der Hybridisierung gibt man ein Sequenzstück mit der komplementären Basenfolge (DIG- markierte cRNA-Sonde) im Vergleich zur gesuchten Sequenz zu dem zu untersuchenden Material. Nach einer Vorhybridisierung bei 70 °C mit Hybridisierungspuffer (1 h) erfolgte die Hybridisierung mit den Sonden der Zielgene in der Konzentration von 1 µg/10 ml Hybridisierungspuffer bei 70 °C über Nacht. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde überschüssige Sonde in mehreren Waschschritten entfernt. Im Folgenden wurde die Membran 1 h in 1 x Blockingpuffer äquilibriert. Die Detektion der DIG-Moleküle erfolgte mit Anti-DIG-Fab-Fragmenten, die mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt waren. Als Substrat für die AP diente 2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat (CDP-Star). CDP-Star wird enzymatisch von AP dephosphoryliert. So entsteht ein metastabiles Dioxetan-Phenolat-Anion, das zerfällt und in alkalischem Milieu bei 466 nm Licht emittiert. Die Lumineszenz wurde über einen Röntgenfilm detektiert. Nach dem Trocknen wurde der Film fotografiert.

### 3.2.7.8 Auswertung und Dokumentation

Die densitometrische Auswertung der Filme erfolgte mit der Software Quantity One 4.0.1 (BioRad). Dabei kam das sogenannte „Volume Rect Tool“ zum Einsatz, mit dessen Hilfe es möglich war, um einzelne Banden Rechtecke gleicher Größe zu legen. Als Parameter diente die relative Pixeldichte innerhalb der Rechtecke. Um den Auftragsfehler zu minimieren, erfolgte die Normalisierung auf GAPDH.

### 3.2.8 Bestimmung der GST-Gesamtaktivität

Die Bestimmung der GST-Gesamtaktivität erfolgt kolorimetrisch (photometrisch) (Habig und Jakoby, 1981). Bei der Methode handelt es sich um einen enzymatischen Aktivitätstest des kontinuierlichen Typs, der es ermöglicht, anhand der Änderung der Lichtabsorption im UV-Bereich die Substratumsetzung durch Messung der Produktbildung zu quantifizieren. Dabei wird die Menge des bei der GST-katalysierten Konjugationsreaktion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion (GSH) gebildeten Reaktionsproduktes (S-2,4-Diphenylglutathion) pro Zeiteinheit spektrophotometrisch bei  $\lambda = 340$  nm erfaßt. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 11 dargestellt. Mit Ausnahme der hauptsächlich hepatisch vorkommenden GST- $\theta$  zeigen alle GST-Isoformen gegenüber CDNB eine relativ hohe GSH-

konjugierende Aktivität (Awasthi *et al.*, 1994).



Abbildung 11: GST-vermittelte Konjugation von CDNB mit GSH zu S-2,4-dinitrophenylglutathion und Chlorwasserstoff

Die Aussaat der Zellen ( $0,4 \times 10^6$  Zellen/well) erfolgt in 6-well-Platten 48 h vor Substanzinkubation. Nach Substanzinkubation wird das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen werden für 5 - 10 min bei 37 °C trypsiniert (500 µl). Die Wirkung des Trypsins wird anschließend durch Zugabe der 3-fachen Menge PBS, dem 0,5 % BSA zugegeben war, abgestoppt. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS erfolgt die Zellzahlbestimmung, bevor die Zellen abzentrifugiert und in 750 µl Homogenisationspuffer aufgenommen werden. Tabelle 7 zeigt das standardisierte Reaktionssystem in einer Küvette.

Tabelle 7: Standardisiertes Reaktionssystem (Küvette)

REAGENZ	KONZENTRATION
Na-K-Phosphatpuffer	0,1 M
Substratkonzentration	1 mM GSH
	1 mM CDNB
EtOH	5 % (durch CDNB-Stammlösung)

Die Messung erfolgte spektralphotometrisch bei  $T = 30$  °C,  $\text{pH} = 6,5$  und  $\lambda = 340$  nm über den Messzeitraum von 5 Minuten. Zur Messung der GST-Aktivität wurden 50 - 100 µl Cytosol im Falle der HT29 und HT29 clone 19 a Zellen, von den LT97 Zellen wurden 100 µl Cytosol eingesetzt.

### 3.2.9 Bestimmung der UGT-Gesamtaktivität

Die Bestimmung der UGT-Gesamtaktivität erfolgte nach der Methode von Collier *et al.* (Collier *et al.*, 2000). Es handelt sich dabei um einen fluorimetrischen Nachweis, bei dem in aus Zellen gewonnenem mikrosomalem Protein die UGT-Enzymaktivität über die Zeit gemessen wird. Als Substrat für die UGT-Isoenzyme 1A1, 1A6, 2B7, 2B15 (Burchell *et al.*, 1995), 1A7, 1A10 (Strassburg *et al.*, 1998a) und 1A8 (Cheng *et al.*, 1998) wird das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (4-MU) eingesetzt, das unter Anwesenheit von aktiven UGTs zu dem weniger fluoreszierenden 4-MU-Glucuronid umgewandelt wird. Diese Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit ist ein Maß für die UGT-Aktivität.

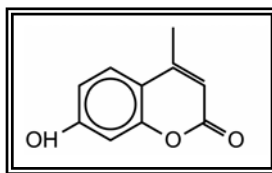


Abbildung 12: Strukturformel von 4-MU

### 3.2.9.1 Gewinnung des mikrosomalen Proteins

Nach der Aussaat von  $2 \times 10^6$  Zellen in  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen erfolgte die Vorinkubation für 24 h, bevor die Zellen mit der entsprechenden Testsubstanz inkubiert wurden. Die Zellernnte erfolgte mit Trypsin, die Trypsinierung wurde mit PBS dem 0,5 % BSA zugesetzt war, gestoppt. Nach der Zentrifugation (1400 rpm, 5 min) wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit dem Trypanblauassay (siehe 3.2.3) wurde die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in Homogenisationspuffer (UGT) aufgenommen. Das Homogenisieren der Zellen erfolgte für 3 min mittels Ultraturrax. Nach dem Zentrifugieren des Homogenats für 20 min (10000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) wurden die Homogenate aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Das Homogenat wurde zur Proteinbestimmung 1:20 verdünnt.

### 3.2.9.2 Messung der UGT-Aktivität

Tabelle 8 zeigt den Aufbau des standardisierten Reaktionssystems zur Messung der UGT-Aktivität mit 4-MU als Substrat.

Tabelle 8: Aufbau des standardisierten Reaktionssystems in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte

	STANDARD-REIHE	BLANK	PROBEN	PROBEN-BLANK
Assaypuffer		105 $\mu\text{l}$		105 $\mu\text{l}$
4-MU in entsprechender Konzentration	105 $\mu\text{l}$		105 $\mu\text{l}$	
Homogenisationspuffer	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$		
Mikrosomales Protein			30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
UDPGA	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

Nach dem Reaktionsstart erfolgte die Messung bei Ex/Em 360/465 nm für 60 min im Abstand von 5 min in einem Mikroplattenreader (Spectra Fluor Plus, Tecan, Österreich). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer 4-MU-Standardkurve umgewandelt und in  $\text{nmol}/\text{min}/10^6$  Zellen angegeben.

### 3.2.10 Reporteragenassay

„Die Aktivität von Promotoren kann man mit Hilfe des sogenannten Reporteragenassays analysieren. Als Reportergene eignen sich solche Gene, deren Genprodukte mit einfachen biochemischen Verfahren nachweisbar sind und in den verwendeten Säugerzellen keine oder nur eine schwache endogene Hintergrundaktivität aufweisen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Mit Hilfe des Reporteragenassays wurde untersucht, inwiefern GTE bzw. EGCG die Bindung an AP-1 und NFκB beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden HT29 Zellen transient transfiziert. Die Plasmide, die Reporter für die Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP1 (siehe Abbildung 13) und NFκB enthalten, stammen aus dem Mercury™ Pathway Profiling SEAP System (Mercury Pathway Profiling System User Manual, Clontech 2001) und wurden durch Lipofektion (Permeabilisierung durch DNA-enthaltende Liposomen) mit Lipofectamin 2000 in HT29 transfiziert.

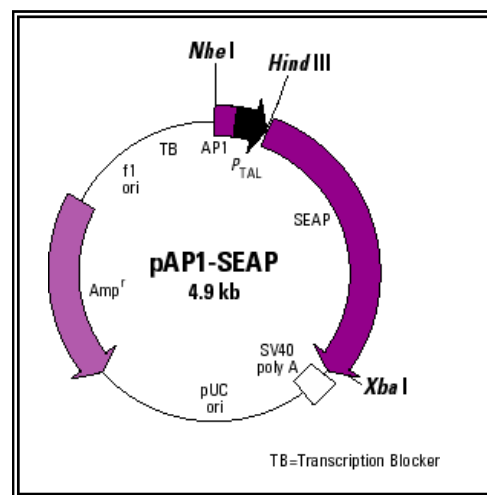


Abbildung 13: Restriction MAP von pAP1-SEAP

An diesen Reportern hängt zusätzlich der Promoter der sezernierenden alkalischen Phosphatase (SEAP). Das pSEAP Basic Plasmid, das den Promoter der SEAP nicht enthielt sowie das pSEAP Kontroll-Vektor, der SEAP unter der Kontrolle des SV40 Promoter exprimiert, wurden als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle eingesetzt. Das System der SEAP gestattet eine Messung im Zellkulturmedium. Jeweils 800 ng der Konstrukte wurden mittels Lipofectamin 2000 in HT29 Zellen transfiziert, die 24 h vorher in 24-Loch-Schalen ausgesät worden waren. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel, wobei einigen der Kavitäten GTE bzw. EGCG zugesetzt wurde (Doppelbestimmung). Nach weiteren 48 h wurden 50 µl aus dem Überstand jeder Kavität abgenommen und mit dem Great EscAPe SEAP detection System wurde die Aktivität der SEAP in weißen Mikrotiterplatten in einem Plattenluminometer gemessen. Die SEAP-Aktivität der Negativkontrolle wurde von allen Werten abgezogen, die SEAP-Aktivität der Positivkontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

### 3.2.11 ELISA zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren

Die Bestimmung der an AP-1 beteiligten Untereinheiten wurde mittels des TransAM Assay (Active Motif, Rixensart, Belgien) nach den Angaben des Herstellers bestimmt (Renard *et al.*, 2001). Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der spezifischen Bindung von AP-1-Untereinheiten an das TRE. Im Falle dieses ELISA wurden 96-Loch-Schalen mit einem Oligonukleotid, das die TRE-Sequenz (5'-TGAGTCA-3') enthielt, genutzt. Nach Inkubation der Schalen mit Zellkernprotein aus behandelten und unbehandelten Zellen sowie einer Negativ- und einer Positivkontrolle, erfolgte der kolorimetrische Nachweis der an die TRE-Sequenz gebundenen AP-1-Untereinheiten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper spektralphotometrisch gemessen werden konnten (Abbildung 14). Als Substrat diente Tetramethylbenzidin. Zur Gewinnung des Zellkernextraktes wurden HT29 Zellen in 6-Lochschalen ausgesät und 48 Stunden nach der Aussaat mit GTE inkubiert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und vom Schalenboden abgeschabt. Die Gewinnung von Zellkernprotein erfolgte mit einem NuclearExtraction Kit (ebenfalls von Active Motif) nach den Angaben des Herstellers. Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach Bradford (siehe 3.2.6.2) (Bradford, 1976). Es wurden 5 µg des Zellkernproteins pro Kavität eingesetzt (1 h, RT). Die Kavitäten wurden dann 3 x gewaschen und die an die AP-1 Bindungsstelle gebundenen AP-1 Untereinheiten mittels spezifischen Antikörpern (gegen c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB and JunD) zugegeben (1 h, RT). Die Kavitäten wurden wiederum gewaschen und mit Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT). Die Kavitäten wurden 4 mal gewaschen und 100 µl Tetramethylbenzidin wurde zugegeben und solange inkubiert, bis eine ausreichende Färbung (blau) erfolgte. Mittels einer im Kit mitgelieferten „Stop-Solution“ wurde die Reaktion gestoppt: es erfolgte ein Farbumschlag (von blau nach gelb). Danach wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Bei der Auswertung wurde die mitgeführte Positivkontrolle (Zellkernextrakt aus K-562 Zellen, die 2 h mit TPA bei 37 °C inkubiert wurden) jeweils 100 % gesetzt.

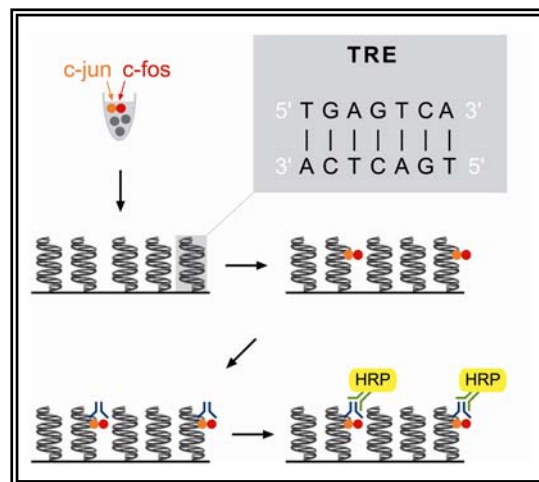


Abbildung 14: Prinzip des ELISA zur Detektion von AP-1-Untereinheiten

### 3.2.12 Arraytechnik zum Nachweis der Genexpression in HT29 und LT97 Zellen

Die Nukleinsäuren-Arraytechnik macht es möglich, die Expression von mehreren Genen in einem einzigen Experiment zu untersuchen. Der in dieser Arbeit benutzte cDNA-Array der Firma Superarray enthält 96 cDNA-Fragmente von Genen, die an der Metabolisierung und Detoxifizierung von Fremdstoffen sowie 4 mehrfach aufgespottete cDNA Fragmente von Hauskeeping-Genen, beteiligt sind (GEArray Q Series, Human, Drug Metabolism and Toxicology Array). Abbildung 15 zeigt den schematischen Ablauf der Methode, der im Folgenden näher beschrieben wird.

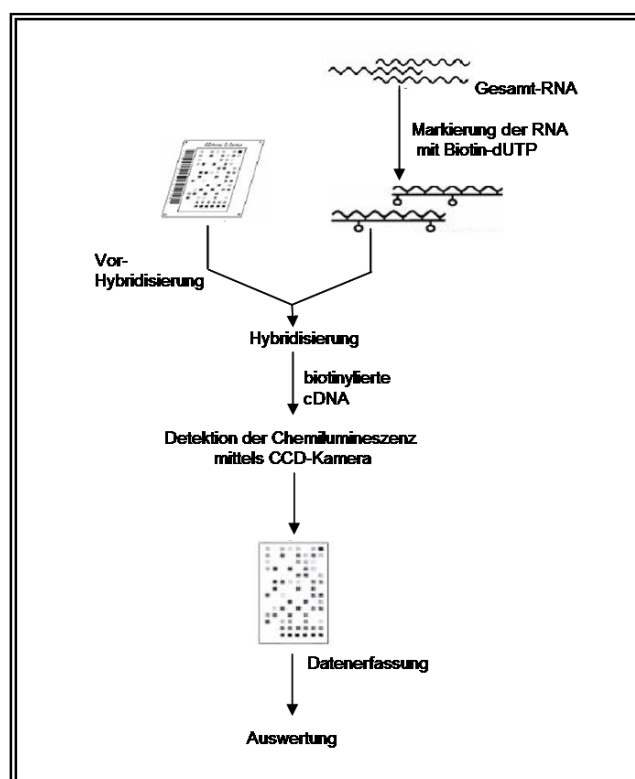


Abbildung 15: Fließschema der Array-Methode

### **3.2.12.1 In-vitro Transkription und Dot-Blot**

Der Umbau der RNA mit gleichzeitiger Biotin-Markierung erfolgte mit dem AMPO-Labeling-Kit der Firma Superarray. Bei dieser Methode wird mit Hilfe von Random Primern und Reverser Transkriptase RNA in cDNA umgebaut. Mit Gen-spezifischen Primern erfolgt dann die Amplifizierung der Transkripte mit gleichzeitigem Biotin-Einbau. Zur Herstellung der cDNA-Sonden wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Qualität der Sonden wurde mittels Dot-Blot überprüft. Hierzu wurden die Sonden in 1:20-Schritten mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf positiv geladene Nylonmembran gespottet. Die Detektion des Biotins erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (siehe unten).

### **3.2.12.2 Hybridisierung und Detektion**

Nach einer Vorhybridisierung mit „GeAPreHyb-Solution“ erfolgte die Hybridisierung der Membranen mit der Sonde in „GeAHyb-Solution“ über Nacht. Die Sonden wurden zuvor 5 min bei 95 °C denaturiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen nach Anleitung des Herstellers mit im Kit enthaltenen Waschpuffern behandelt, bevor eine 60-minütige Blockierung (mit „Blocking Solution“, der Lachsspermien-DNA zugesetzt wurde) erfolgte. Zum Nachweis von Biotin wurde Anti-Biotin-AP-Antikörper in der Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Die Behandlung dauerte 30 Minuten. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion der AP (Chemilumineszenz) mit CDP-Star. Die Lumineszenz wurde über einen Röntgenfilm detektiert, im Anschluss erfolgte die Entwicklung und Fixierung des Films. Nach dem Trocknen wurde der Film fotografiert. Desweiteren erfolgte die Detektion der Lumineszenz über eine CCD-Kamera (LAS 1000, Fuji).

### **3.2.12.3 Auswertung und Dokumentation**

Die mittels CCD-Kamera erhaltenen Bilder wurden mit der AIDA Microarray Software (Fuji) densitometrisch ausgewertet. Mit Hilfe dieser Software war es möglich, ein Raster über die Membran zu legen, das sowohl die einzelnen Spots erkannte als auch in der Lage war, den Hintergrund mit einzubeziehen bzw. herauszurechnen. Die Rohdaten wurden durch die Differenz aus „Integral - Background“, die für jeden Spot erhalten wurde, charakterisiert. Diese wurde in der Einheit „Signal unit“ (SU) dargestellt (die Summe der sogenannten „Spot-Intensitäten“). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003 und ist unter 4.3.1 beschrieben.

### 3.2.13 Ergebnisdarstellung und Auswertung

Die in den Tabellen und Grafiken gezeigten Resultate ergeben sich aus unterschiedlichen Anzahlen von Einzelexperimenten, die bei der jeweiligen Darstellung angegeben ist. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Lebendzellzahlbestimmung und zum Proliferationsverhalten wurden prozentual auf die unbehandelte Mediumkontrolle (100 % Wert) bezogen. Die in dieser Arbeit gezeigten grafischen Darstellungen beinhalten Mittelwerte und deren Standardabweichungen, berechnet aus der Ergebniszusammenfassung der unabhängigen Einzelexperimente. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Messreihen wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben bei Varianzhomogenität nach F-Test und Normalverteilung. Bei Messreihen, in denen sich die einzelnen Messpunkte in einem Parameter änderten (Zeit, Konzentration), wurde der Test nach Bonferroni angewendet (Testung aller Gruppen gegen alle Gruppen). Dargestellt wurden jeweils nur die Signifikanzen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei einer Wahrscheinlichkeit mit  $p < 0,05$  wird das Prüfergebnis als signifikant gewertet. In den Grafiken werden  $p < 0,05$  mit \*,  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,001$  mit \*\*\* kenntlich gemacht. Zur statistischen Berechnung wurden die Programme EXCEL und GraphPad Prism 4.01 genutzt. Einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit angewendeten molekularbiologischen und biochemischen Methoden ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Zellen wurden inkubiert, Zellzahl und Vitalität bestimmt und anschließend das Cytosol für die Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber CDNB sowie der UGT-Aktivität gegenüber 4-MU und des Gesamtproteins extrahiert sowie RNA für die Bestimmung der *c-jun*, *c-fos* oder *GSTP1* mRNA-Expression isoliert. RNA wurde auch eingesetzt, um mittels cDNA Array die differenzielle Expression von 96 Metabolismus-relevanten Genen zu bestimmen. Es wurde Zellkernprotein isoliert, um die Bindungsaktivität der AP-1-Untereinheiten mittels ELISA zu bestimmen. Ein Zelllysats aus Gesamtprotein diente zur Bestimmung der Aktivierung von verschiedenen MAP Kinasen. Die Untersuchung der metabolischen Aktivität der Zellen erfolgte „on line“ an lebenden Zellen. Als weitere funktionelle Parameter wurden DNA-Gehalt, DNA-Synthese und Zellviabilität nach Behandlung mit EGCG/GTE bestimmt.



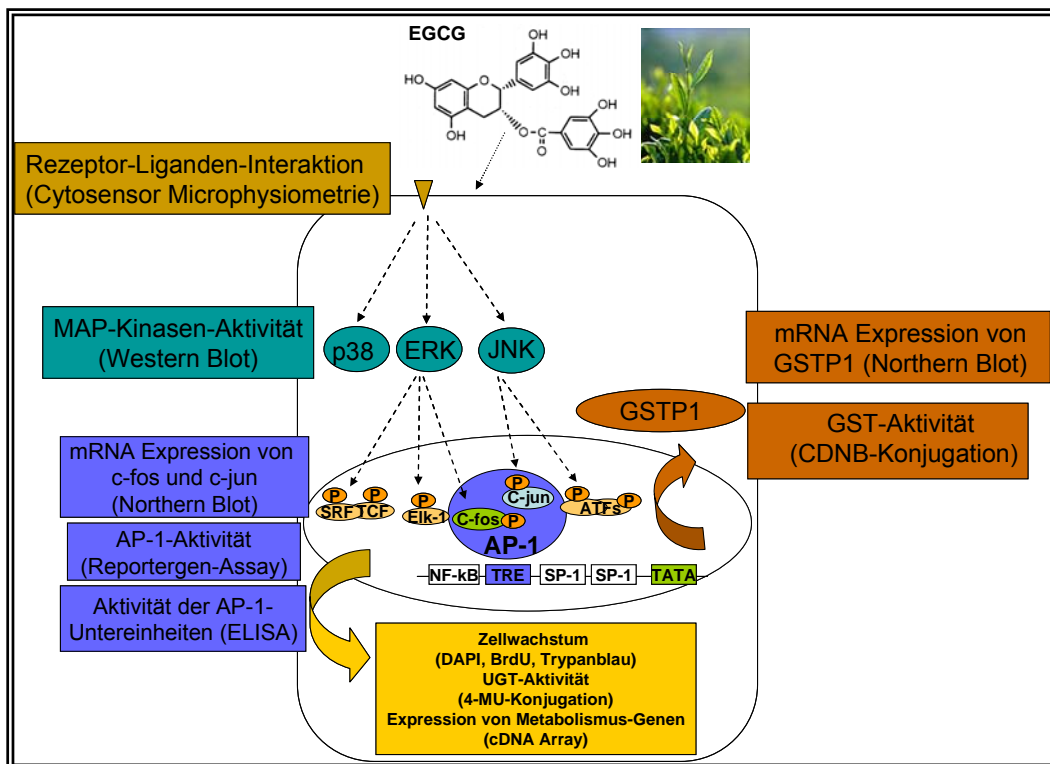


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der angewendeten Methoden

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von Grüntee catechinen auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion und MAP Kinase Signaltransduktionswege

#### 4.1.1 Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grüntee catechine

Die Messung der Ansäuerungsrate als Maß für die metabolische Aktivität gibt u.a. Aufschluss darüber, ob die Wirkung der Testsubstanz auf einer generellen Rezeptor-Liganden-Interaktion beruht, da die wesentliche physiologische Konsequenz der Rezeptoraktivierung die Exkretion säurehaltiger Produkte aus der Zelle ist.

Um die Wirkung des komplexen GTE mit seinen Hauptinhaltsstoffen zu vergleichen, wurden HT29 und HT29 clone 19 a Zellen mit dem komplexem Substanzgemisch GTE, vier verschiedenen Grüntee catechinen (EGCG, EGC, ECG und EC) sowie „synthetischem Grüntee“ (Kombination aus EGCG, EGC, ECG, EC sowie Gallussäure in Anlehnung an die Gehalte an Grüntee catechinen, die sich im GTE befinden), alle in der Konzentration von 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE, im Zytosensor getestet.

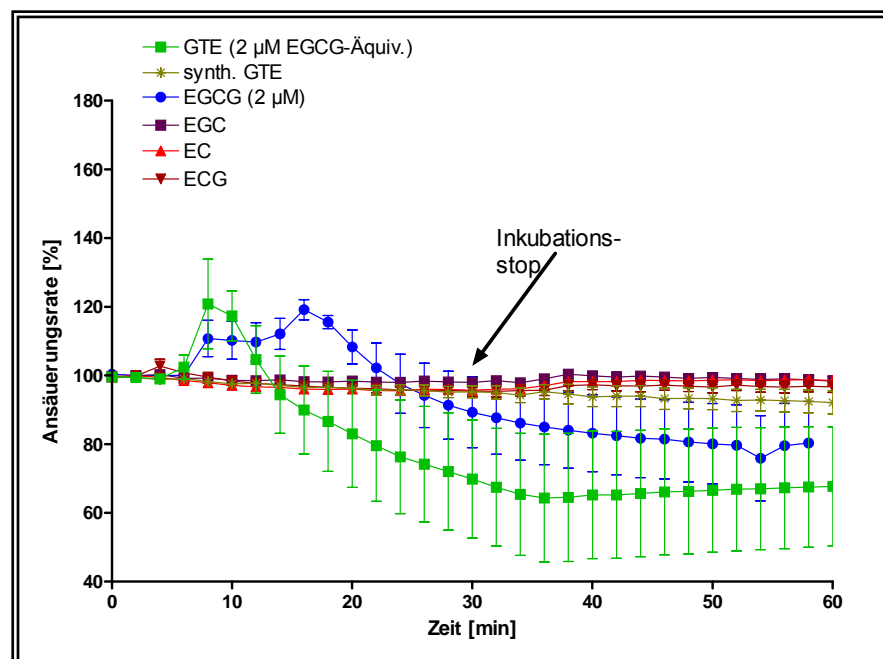


Abbildung 17: Metabolische Aktivität von HT29 Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Teekatechinen, synthetischen GTE und GTE

Teekatechine wurden in der Konzentration von 2  $\mu$ M bzw. 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten zu den Zellen gegeben; MW in %  $\pm$  SEM, n = 7

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass HT29 Zellen nur bei der Behandlung mit GTE und EGCG mit einer Änderung der AR reagierten, alle weiteren Testsubstanzen hatten keinen Einfluss. Sowohl GTE als auch EGCG führten zu einer vorübergehenden leichten Erhöhung der AR. Zum Zeitpunkt des Inkubationsstops (nach 30-minütiger Behandlung) war die AR

allerdings in beiden Fällen bereits unter das Ausgangsniveau (100 %) gesunken.

In HT29 clone 19a Zellen führten alle getesteten Substanzen bis auf EC zu einem dauerhaften Anstieg der AR (Abbildung 18) über die Behandlungsdauer hinaus.

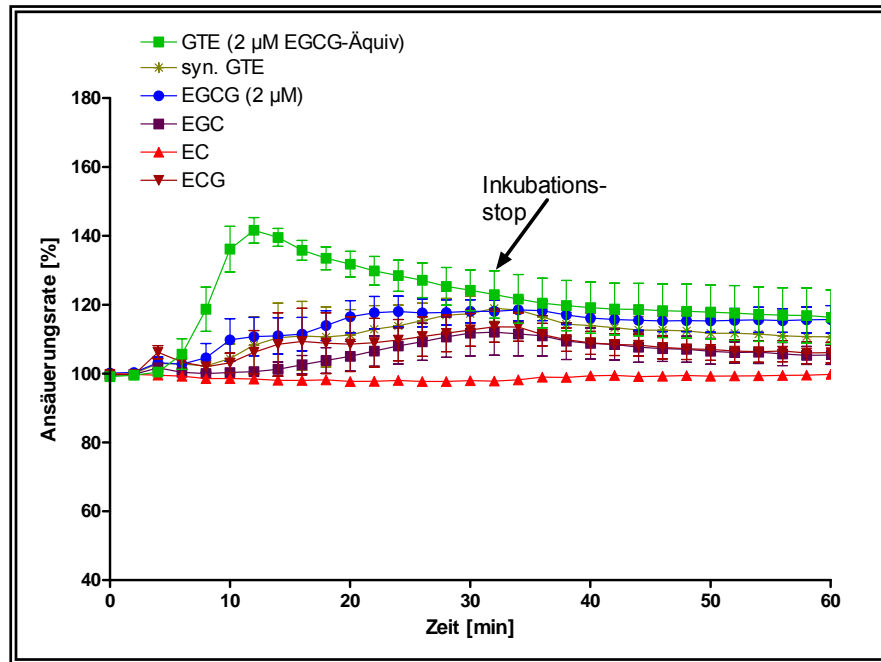


Abbildung 18: Metabolische Aktivität von HT29 clone 19 a Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Teekatechinen, synthetischen GTE und GTE

Teekatechine wurden in der Konzentration von 2 µM bzw. 2 µM EGCG-Äquivalenten zu den Zellen gegeben; MW in % ± SEM, n = 4

Dabei war zu beobachten, dass die Behandlung mit GTE zu einer maximalen Erhöhung der AR um 45 % (nach 12 Minuten) führte. GTE beeinflusste die AR stärker als die einzelnen Grüntee catechine. Im Gegensatz zu der Stammzelllinie HT29 reagierte der differenzierte Klon auch auf den „synthetischen GTE“ mit einer Erhöhung der AR; der Kurvenverlauf war dabei dem von EGC und ECG ähnlich.

#### 4.1.2 Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grünteeextrakt, epidermalen Wachstumsfaktor und die Kombination aus beiden Substanzen

Abbildung 19 zeigt die Änderung der AR in HT29 Zellen während des Durchflusses des komplexen GTE sowie von EGF und der Kombination aus beiden Substanzen. HT29 Zellen reagierten auf EGF in gleicher Weise wie HT29 clone 19 a Zellen (Plateauphase bei 128 % 12 – 20 Minuten nach Substanzzugabe). GTE in der Konzentration von 2 µM EGCG-Äquivalenten führte zu einem schnellen kurzfristigen Anstieg der AR mit einem Peak von 115 % nach 14 min; dann fiel die AR deutlich unter das Ausgangsniveau von 100 %. Die Reaktion der HT29 Zellen beim Durchfluss der Substanz-Kombination aus GTE und EGF entsprach der Reaktion der HT29 clone 19 a Zellen, wenn auch schwächer (142 % ± 6 % - 10 Minuten nach Substanzzugabe). Auch hier kam es nach Erreichen des Maximums zu einem schnellen Abfall der AR unter das Ausgangsniveau.

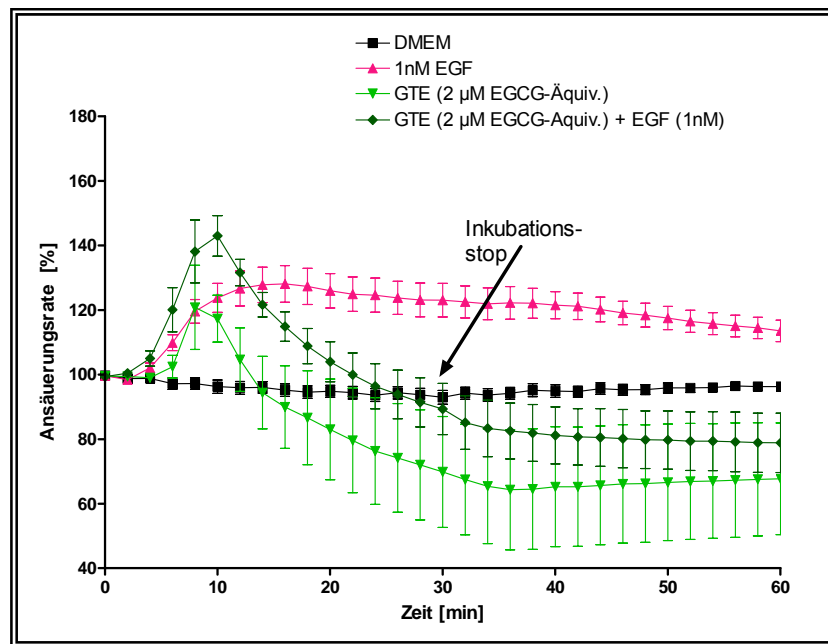


Abbildung 19: Metabolische Aktivität von HT29 Zellen nach Inkubation mit DMEM, 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE, 1 nM EGF und der Kombination aus 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE und 1 nM EGF

(MW in % ± SEM, n = 4)

GTE konnte die AR und damit die metabolische Aktivität von HT29 clone 19 a Zellen ebenso erhöhen (141 % ± 3,7 % nach 12-minütiger Inkubation) wie 1 nM EGF (Plateauphase bei 130 % 10-18 Minuten nach Substanzzugabe) (Abbildung 20).

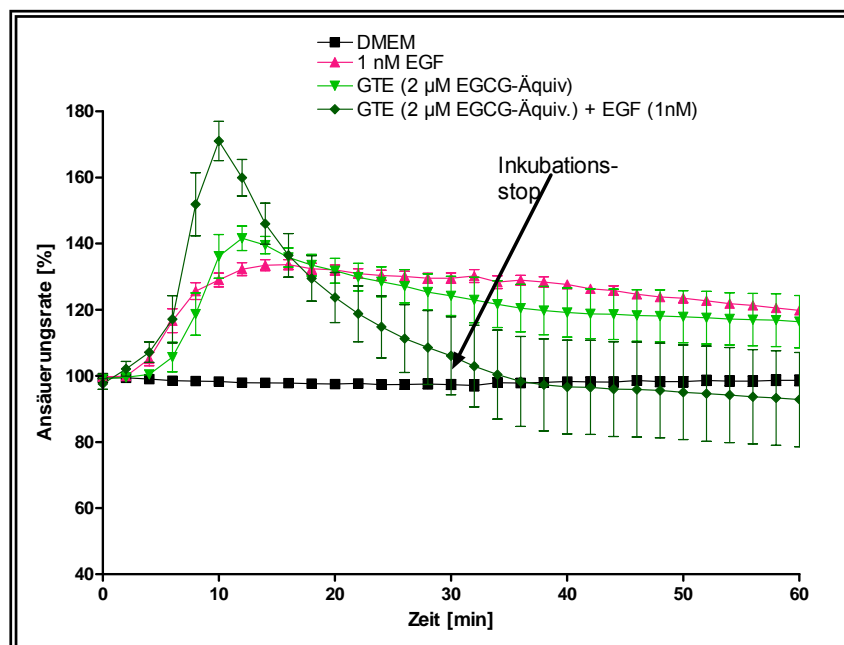


Abbildung 20: Metabolische Aktivität von HT29 clone 19 a Zellen nach Inkubation mit DMEM, 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE, 1 nM EGF und der Kombination aus 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE und 1 nM EGF

(MW in % ± SEM, n = 4)

Die Kombination aus EGF und GTE führte zu einem stärkeren Anstieg der AR als nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen ( $171 \% \pm 5,9 \%$  nach 10-minütiger Inkubation). Aus Tabelle 9, in der die durch die Zytosensor Mikrophysiometrie erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst dargestellt sind, geht hervor, dass HT29 clone 19a Zellen gegenüber den Testsubstanzen deutlich sensibler reagieren als ihre Stammzelllinie HT29.

*Tabelle 9: Vergleich von HT29 clone 19a und HT29 Zellen hinsichtlich der maximal ( $AR_{max}$ ) bzw. minimal ( $AR_{min}$ ) erreichten Ansäuerungsraten nach Behandlung mit den Testsubstanzen*

*MW in  $\% \pm SEM$ ,  $n=4-7$ ; - keine Änderung*

BEHANDLUNG	ZELLINIE			
	HT29 clone 19a		HT29	
	$AR_{max}$ (Zeitpunkt)	$AR_{min}$ (Zeitpunkt)	$AR_{max}$ (Zeitpunkt)	$AR_{min}$ (Zeitpunkt)
2 $\mu$ M EGCG-Äquiv. GTE	142 $\pm$ 3,7 (12 min)	116 $\pm$ 7,9 (60 min)	120 $\pm$ 13,7 (8 min)	68 $\pm$ 17,3 (60 min)
„Synth. GTE“	119 $\pm$ 3,8 (32 min)	111 $\pm$ 4,5 (60 min)	-	92 $\pm$ 3,3 (60 min)
EGCG	118 $\pm$ 4,5 (24 min)	116 $\pm$ 4 (60 min)	119 $\pm$ 2,9 (16 min)	80 $\pm$ 12,2 (60 min)
EGC	112 $\pm$ 6,7 (32 min)	105 $\pm$ 2,8 (60 min)	-	-
ECG	114 $\pm$ 4,5 (32 min)	106 $\pm$ 2,3 (60 min)	-	-
EC	-	-	-	-
1 nM EGF	134 $\pm$ 1,5 (12 min)	119 $\pm$ 1,2 (60 min)	121 $\pm$ 10,4 (12 min)	114 $\pm$ 3,3 (60 min)
Kombination aus 2 $\mu$ M EGCG-Äquiv. GTE und 1 nM EGF	171 $\pm$ 5,9 (10 min)	92 $\pm$ 14,8 (60 min)	143 $\pm$ 6,3 (10 min)	79 $\pm$ 9,3 (60 min)

#### 4.1.3 Charakterisierung von LT97 Zellen mit Hilfe der Zytosensor Mikrophysiometrie

Zur Frage, ob die Zytosensor-Mikrophysiometrie auch geeignet ist, die metabolische Aktivität in der langsam wachsenden Adenomzelllinie LT97 zu erfassen, wurden Vorversuche mit der mitogen wirkenden Substanz EGF durchgeführt. Die untersuchten Konzentrationen orientierten sich dabei an den EGF-Konzentrationen, die in den beiden Zelllinien HT29 und HT29 clone 19a zu einer Erhöhung der metabolischen Aktivität führte. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zytosensor Mikrophysiometrie ebenfalls für die Untersuchung der Adenomzelllinie LT97 eignet. Die Behandlung dieser Zellen mit steigenden Konzentrationen EGF führte zu einem dosisabhängigen sofortigen Anstieg der AR, der 20 Minuten nach der Zugabe von EGF in der Konzentration von 5 nM sein Maximum ( $124,7 \% \pm 8,2 \%$ ) erreichte und bis zum Zeitpunkt  $t_{70}$  noch nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurückgefallen war (Abbildung 21).

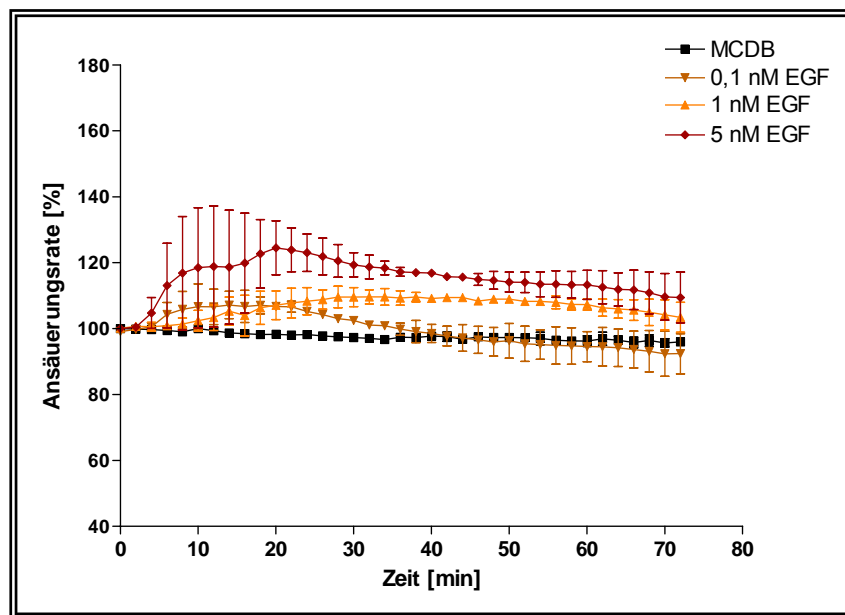


Abbildung 21: Änderung der extrazellulären Ansäuerungsrate in LT97 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen EGF

$n = 2, MW \pm SEM$

#### 4.1.4 GTE- bzw. EGCG-vermittelte Modulation der Aktivität der MAP Kinasen ERK, JNK und p38

MAPK Signalkaskaden stellen einen generellen Mechanismus der Zelle dar, um Signale von der Zellmembran zum Zellkern weiterzuleiten. Die Modulation der Aktivität der Endpunkte der drei wichtigsten MAPK Signalwege in Säugerzellen nach Behandlung mit GTE und EGCG wurde mit Hilfe des Western Blots untersucht. Zum Einsatz kamen dabei phosphospezifische Antikörper gegen die MAP Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 sowie ein Antikörper, der spezifisch für die ERK, unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus, war. In Abbildung 22 und 23 sind Blotbilder aus jeweils 4 (HT29) bzw. 3 (HT29 clone 19 a) unabhängigen Versuchen dargestellt. GTE aktivierte in HT29 Zellen die ERK in allen eingesetzten Dosen bis zu 8 h nach Inkubationsbeginn. Die höchste Dosis (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) konnte die ERK bis zu 48 h aktivieren. Die Aktivierung der MAPK JNK erfolgte in HT29 Zellen nur durch die höchste GTE-Konzentration (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) sowie durch EGCG (8  $\mu$ M). Dabei war eine Aktivität bis zu 48 h nach Inkubation zu beobachten. Der Einfluss von GTE auf die Aktivierung der MAPK p38 war in HT29 Zellen dosisabhängig nach 48-stündiger Inkubation zu beobachten, allerdings konnte p38 nur durch GTE, nicht aber durch EGCG aktiviert werden.

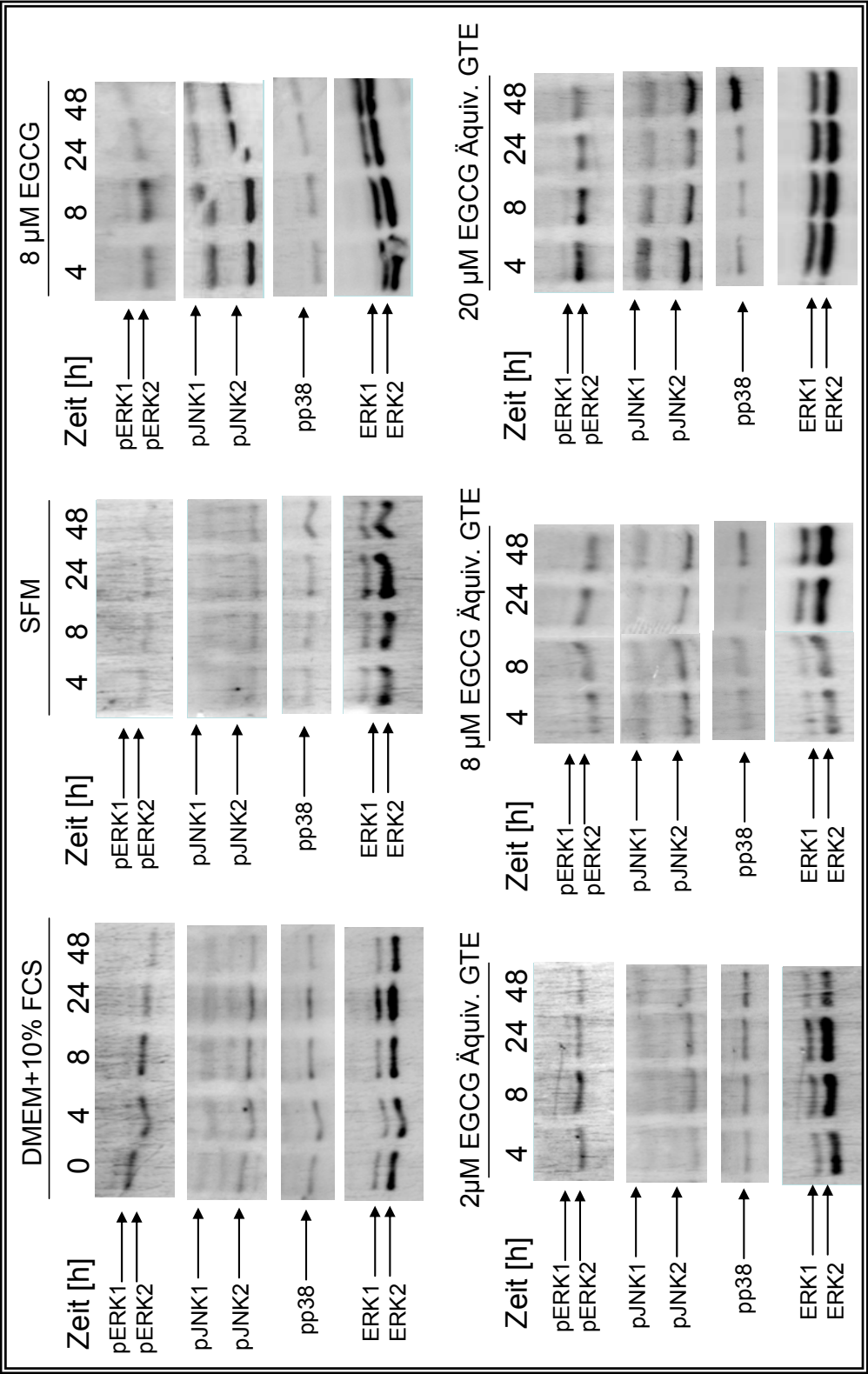


Abbildung 22: Aktivierung der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 sowie Proteinexpression der Gesamt-ERK durch verschiedene Konzentrationen GTE (2, 8 und 20 μM EGCG-Äquivalente) und EGCG (8 μM) in HT29 Zellen

Die Phosphorylierung wurde mittels Western Blot Verfahren untersucht. Es wurden jeweils 15 μg Protein aufgetragen. Dargestellt sind Beispielblots eines Experiments aus n = 4 Versuchen; pERK phosphorylierte ERK, pJNK phosphorylierte JNK; pp38 phosphoryliertes p38; ERK gesamte ERK

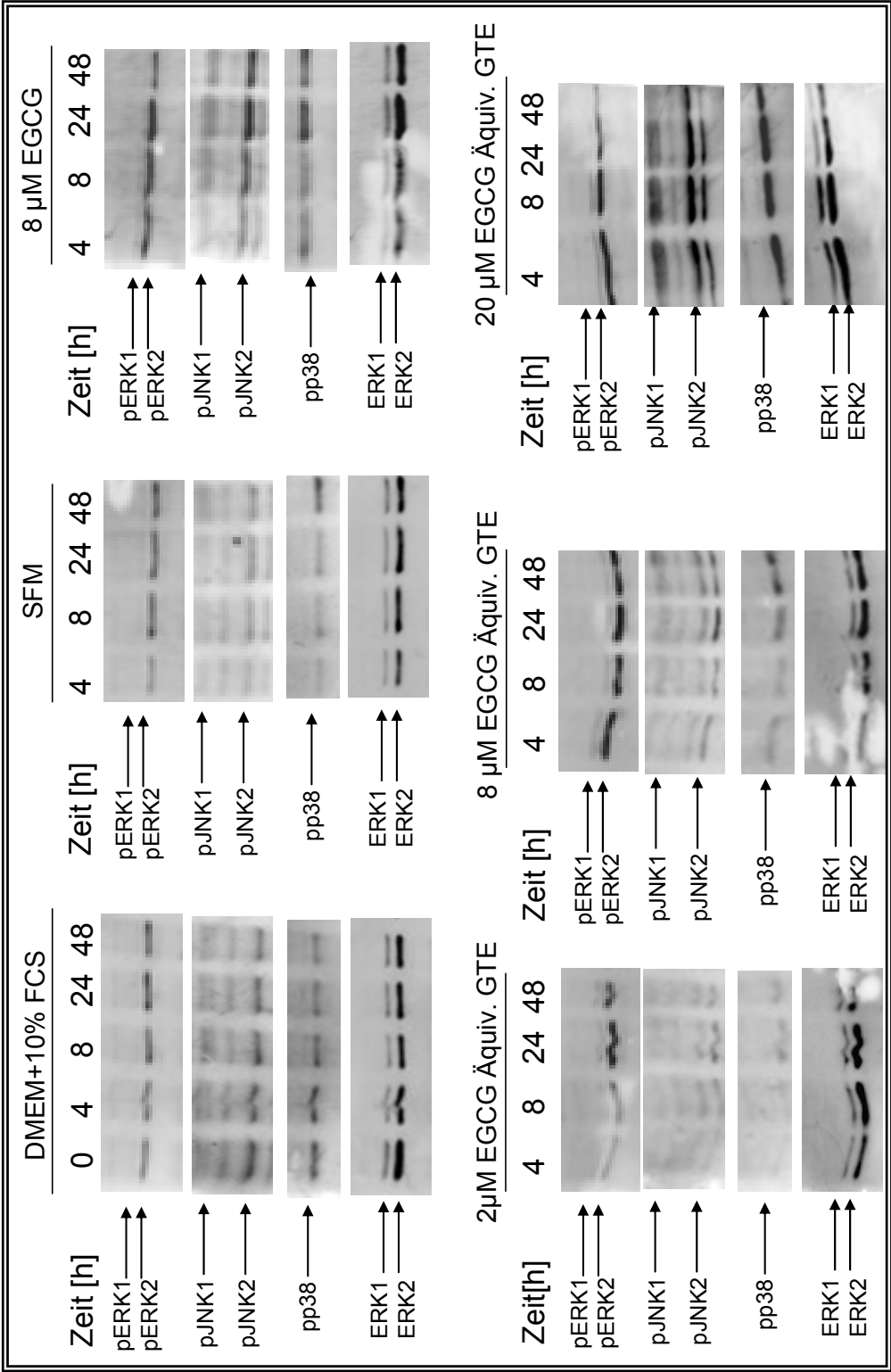


Abbildung 23: Aktivierung der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 sowie Proteineexpression der Gesamt-ERK durch verschiedene Konzentrationen GTE (2, 8 und 20 μM EGCG-Äquivalente) und EGCG (8 μM) in HT29 clone 19 a Zellen

Die Phosphorylierung wurde mittels Western Blot Verfahren untersucht. Es wurden jeweils 15 μg Protein aufgetragen. Dargestellt sind Beispielblots eines Experiments aus n = 3 Versuchen; pERK phosphorylierte ERK, pJNK phosphorylierte JNK; pp38 phosphoryliertes p38; ERK gesamte ERK



In HT29 clone 19 a Zellen aktivierten GTE und EGCG die ERK ebenfalls bis zu 48 h. Die Aktivierung der MAPK JNK erfolgte in HT29 clone 19 a Zellen nur durch die höchste GTE-Konzentration (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) sowie durch EGCG (8  $\mu$ M). Dabei war eine Aktivität bis zu 48 h nach Inkubation zu beobachten. In HT29 clone 19 a Zellen erfolgte die Aktivierung der p38 analog zur Aktivierung der JNK. Nur die höchste der untersuchten GTE-Konzentrationen (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) konnte ebenso wie EGCG in der Konzentration von 8  $\mu$ M die Aktivität der p38 bewirken.

Trotz hoher Proteinmengen (bis zu 60  $\mu$ g Protein), die eingesetzt wurden, war in LT97 Zellen keine Detektion der phosphorylierten ERK möglich. Die sehr starken Banden der Gesamt-ERK belegen aber die Expression in LT97 Zellen (Abbildung 24).

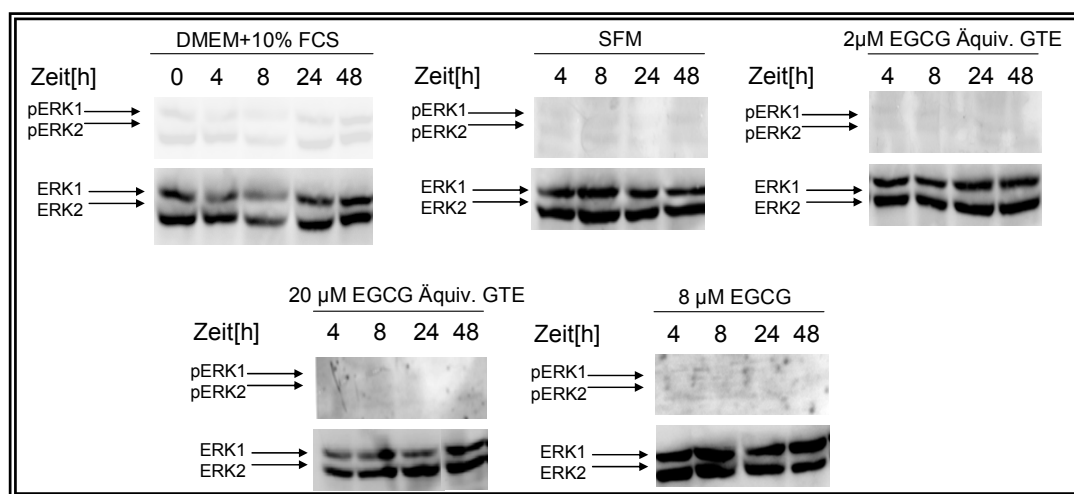


Abbildung 24: Proteinexpression der phosphorylierten ERK sowie der Gesamt-ERK durch verschiedene Konzentrationen GTE (2 und 20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) und EGCG (8  $\mu$ M) in LT97 Zellen

Es wurden jeweils 60  $\mu$ g Protein aufgetragen. Dargestellt sind Beispielblots eines Experiments aus  $n = 4$  Versuchen; pERK phosphorylierte ERK,

Eine statistische Auswertung der Western Blots war aufgrund der zu verschiedenen Zeiten nicht detektierbaren Banden (z.B. keine Phosphorylierung der ERK/JNK/p38 in der SFM-Kontrolle von HT29 Zellen) nicht möglich (siehe auch 3.2.6.6). In Tabelle 10 ist daher eine zusammengefasste Darstellung des mittels spezifischer Antikörpers im Western Blot indentifizierten Phosphorylierungsstatus der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 nach der Inkubation der drei untersuchten Zelllinien mit GTE bzw. EGCG zu sehen.

*Tabelle 10: Darstellung der Western Blot Ergebnisse zur Identifizierung des Phosphorylierungsstatus der drei MAP Kinasen ERK, JNK und p38 in HT29 Zellen*

*Zusammengefasst aus n=4 Versuchen; - nicht detektierbar; + leichte Induktion (Quotient aus Pixeldichte pMAPK/ERK > 0,3); ++ mittlere Induktion (Quotient aus Pixeldichte pMAPK/ERK > 0,5); +++ starke Induktion (Quotient aus Pixeldichte pMAPK/ERK > 0,75); n.u. nicht untersucht*

BEHANDLUNG		SERUMHALTIGES MEDIUM					SERUMFREIES MEDIUM				8 µM EGCG			
Zeit [h]		0	4	8	24	48	4	8	24	48	4	8	24	48
HT29	pERK	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-
	pJNK	-	++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+++	++	++
	pp38	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HT29 clone 19a	pERK	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+++	+++	+++	++
	pJNK	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++	++	++	++
	pp38	++	++	+	-	-	-	-	-	++	++	+	++	++
LT97	pERK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BEHANDLUNG		2 µM EGCG-ÄQUIVALENTE GTE				8 µM EGCG-ÄQUIVALENTE GTE				20 µM EGCG-ÄQUIVALENTE GTE				
Zeit [h]		4	8	24	48	48	4	8	24	48	8	24	48	
HT29	pERK	+	++	-	-	++	++	+	+	+++	+++	+	+	
	pJNK	-	++	+	+	++	++	+	++	+++	+++	++	+++	
	pp38	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+++	
HT29 clone 19a	pERK	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
	pJNK	-	-	-	-	+	-	+	+	++	+++	+++	+++	
	pp38	-	-	-	-	+	-	+	+	++	++	++	+++	
LT97	pERK	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-	

## 4.2 GTE-bzw. EGCG-vermittelte Modulation des Transkriptionsfaktors AP-1 in humanen Kolonzelllinien

### 4.2.1 Einfluss von GTE und EGCG auf die mRNA Expression der AP-1-Untereinheiten *c-jun* und *c-fos*

Die IEGs *c-jun* und *c-fos* können unmittelbar nach der Stimulation transkribiert werden und lassen sich durch verschiedene externe Faktoren aktivieren. Dies sind u. a. Tumorpromotoren wie 12-O-Tetradecanoyl Phorbol 13-Acetat (TPA), Zytokine, Wachstumsfaktoren, alkylierende Agenzien und UV-Strahlung sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS). GTE und EGCG führten in HT29 Zellen zu einer Induktion der mRNA-Expression von *c-jun* und *c-fos* (Abbildung 25). Das Expressionsmaximum von beiden IEGs war nach 30 min erreicht. Die mRNA Expression von *c-jun* war im Gegensatz zur mRNA Expression von *c-fos* auch nach 60-minütiger Inkubation mit GTE/EGCG noch deutlich erkennbar. Zum Zeitpunkt  $t_0$  lag keine mRNA-Expression von *c-jun* und *c-fos* vor.

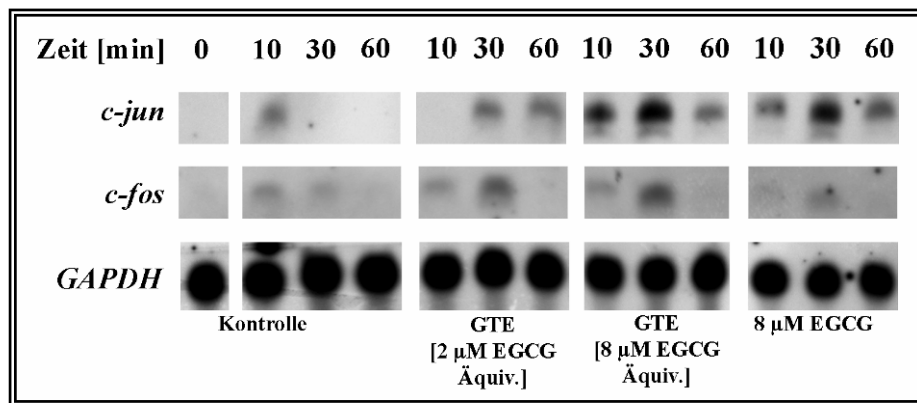


Abbildung 25: Northern Blot Analyse zur Identifikation der „immediate early genes“ *c-jun* und *c-fos* in HT29 nach Behandlung der Zellen mit GTE bzw. EGCG bis zu 60 min

Beispielblot von 4 unabhängigen Versuchen

Aus Abbildung 25 wird weiterhin deutlich, dass die GTE/EGCG-vermittelte Induktion der mRNA Expression der beiden IEGs konzentrationsabhängig war. Die durch GTE/EGCG induzierte mRNA Expression von *c-jun* war stärker als die von *c-fos*.

Neben der Kurzzeitinkubation mit GTE bzw. EGCG bis zu 60 Minuten wurde untersucht, inwieweit eine längerfristige Inkubation (24 h) die mRNA-Expression von *c-jun* und *c-fos* beeinflussen kann. GTE induzierte mit steigender Konzentration die Expression von *c-jun*, wobei nur die höchste eingesetzte Konzentration von 20 µM EGCG-Äquivalenten GTE zu einem signifikanten Ergebnis führte (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu führte eine 24-stündige Behandlung der HT29 Zellen mit 8 und 20 µM EGCG-Äquivalenten GTE zu einer tendenziell verminderten Expression von *c-fos*. GTE in der Konzentration von 2 µM EGCG-Äquivalenten beeinflusste die Expression beider Gene nicht signifikant.

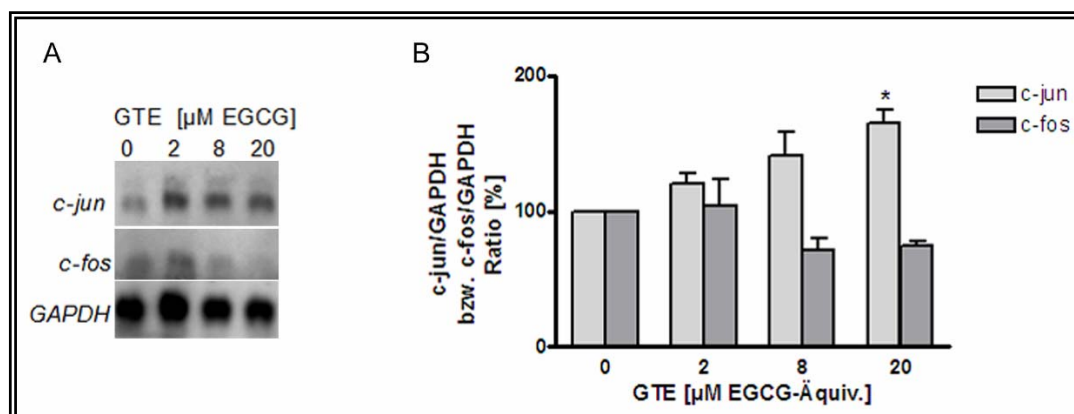


Abbildung 26: Northern Blot Analyse zur Identifikation der „immediate early genes“ *c-jun* und *c-fos* in HT29 nach Behandlung der Zellen mit GTE für 24 h

A Beispielblot; B Statistische Auswertung aus  $n=3$  unabhängigen Versuchen,  $MW \pm SEM$ , One Way ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $*p<0,05$

#### 4.2.2 Einfluss von GTE und EGCG auf die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 an TRE

Abbildung 27 zeigt den Einfluss von GTE (2  $\mu$ M bzw. 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) und EGCG (8  $\mu$ M) auf die Promoterbindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1. Desweiteren wurde die Promoterbindungsaktivität von NF $\kappa$ B untersucht. Die in diesem Versuchsansatz als Positivkontrolle fungierende sezernierende alkalische Phosphatase (SEAP) wurde ebenfalls in die Zellen transfiziert und entsprechend jeweils auf 100 % normiert.

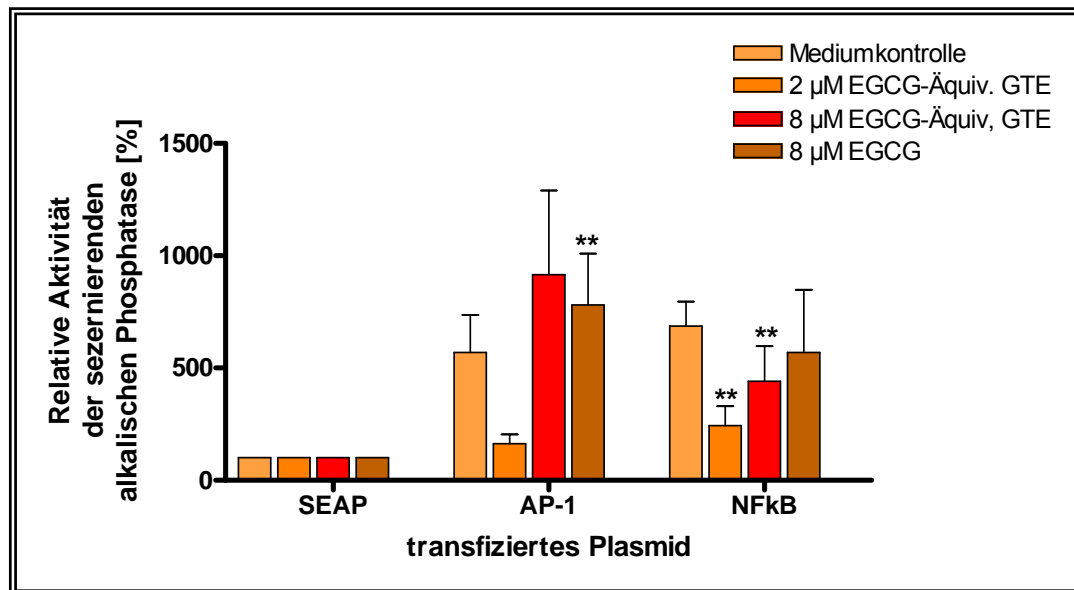


Abbildung 27: Einfluss einer Behandlung mit GTE bzw. EGCG auf die Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B in HT29, gemessen mittels Reporter Gen Assay

$n=3$ ;  $MW \pm SEM$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ; One way ANOVA (GTE) bzw. ungepaarter t-test (EGCG); die SEAP-Kontrolle wurde jeweils 100 % gesetzt

Die Behandlung von HT29 Zellen mit GTE in der Konzentration von 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten führte zu einer tendenziell verminderten transkriptionellen Bindung an AP-1 (von  $569 \pm 168$  % der Kontrolle auf  $163 \pm 40$  % durch die Behandlung mit 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE), wohingegen die GTE-Konzentration von 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten die Bindungsaktivität an AP-1 tendenziell induzierte ( $915 \pm 374$  %). Die Behandlung der Zellen mit 8  $\mu$ M EGCG führte zu einer Induktion von AP-1 ( $781 \pm 228$  %). Die Bindung an den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wurde sowohl durch GTE als auch durch EGCG gehemmt, wobei auch hier GTE in der Konzentration von 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten den stärksten Effekt auf die transkriptionelle Bindung an die NF $\kappa$ B-Bindungsstelle hatte und die Bindungsaktivität um das 2,8-fache reduzierte (von  $687$  %  $\pm$   $108$  % in der Kontrolle auf  $242 \pm 86$  %).

### 4.2.3 Identifizierung der an der AP-1-Aktivität beteiligten AP-1-Untereinheiten und Einfluss von GTE auf deren Bindungsaktivität an TRE

Die Bestimmung der an der AP-1 Modulation beteiligten Untereinheiten erfolgte mittels einer kommerziell erhältlichen ELISA-Technik. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass die Behandlung von HT29 Zellen mit GTE die Bindung der Protein-Untereinheiten von AP-1, c-fos, c-jun und FosB änderte, wohingegen die Bindung der übrigen untersuchten AP-1 Untereinheiten Fra-1, Fra-2, JunB und JunD unverändert war. Die Aktivität von AP-1, die c-fos-vermittelt war, wurde durch GTE dosisabhängig signifikant um das 1,7-fache (2  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE) bzw. um das 2,2-fache (8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE) vermindert, wohingegen die c-jun -vermittelte AP-1-Aktivität signifikant um das 1,9-fache (2  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE) bzw. das 2,3-fache (8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE) erhöht wurde. Auffällig war die schon in der Kontrolle hohe Bindungsaktivität von FosB (789  $\pm$  70 %), die durch GTE konzentrationsabhängig noch um das 1,9- bzw. 2,3-fache gesteigert werden konnte (2  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE: 1488  $\pm$  387 %; 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE: 1842  $\pm$  483 %). Aufgrund der hohen Standardabweichung führt im Fall von FosB nur die Inkubation mit der höheren GTE-Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung.

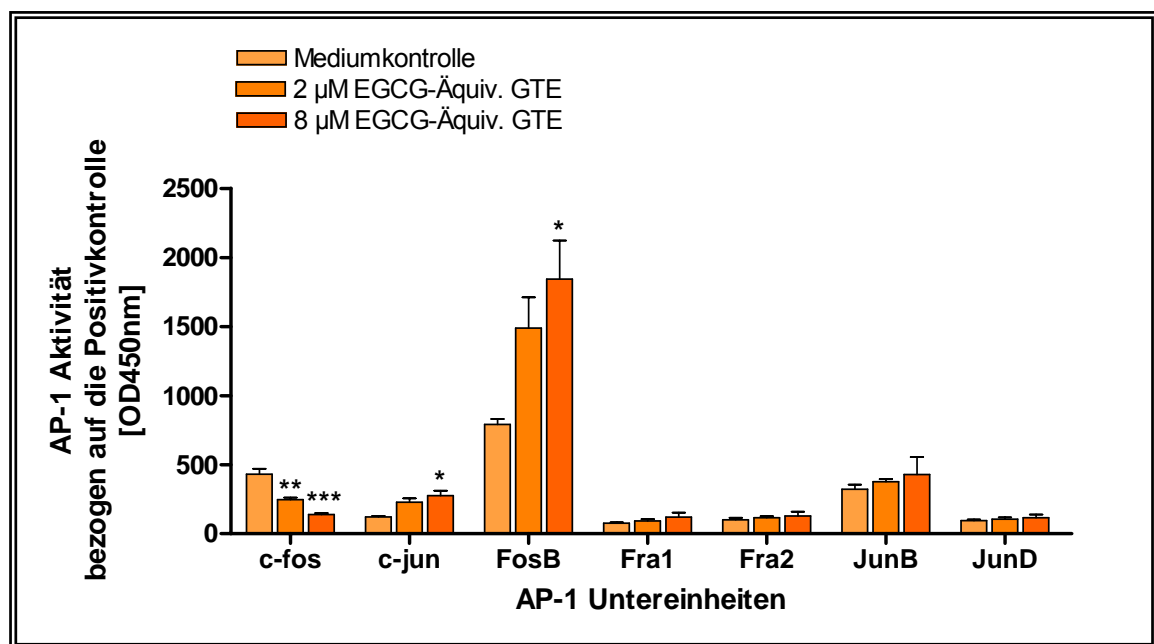


Abbildung 28: DNA-Bindungsaktivität an AP-1 nach Behandlung von HT29 Zellen mit 0, 2 und 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE

Die Zellkernextrakte wurden 48 h nach GTE-Zugabe gewonnen. Zur Bestimmung der Bindungsaktivität wurden jeweils 5  $\mu$ g Zellkernextrakt eingesetzt. (n=3; MW  $\pm$  SEM, \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001; One-way ANOVA mit Bonferroni Post Test)

### 4.3 Einfluss von GTE auf die Expression von Fremdstoffmetabolismus-assozierten Genen in Kolonzellen

#### 4.3.1 Etablierung eines cDNA Arrays zur Erfassung der Wirkung von GTE auf die Expression von Fremdstoffmetabolismus-relevanten Genen in Kolonzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche cDNA-Array-Technik, mit der die Genexpressionsanalyse von 96 Genen, die mit der Giftung, Metabolisierung und Entgiftung von Xenobiotika assoziiert sind (sowie von zusätzlich 4 Housekeeping Genen, die mehrfach auf die Membranen gespottet sind), etabliert. Die Anordnung der Gene auf einer solchen Membran ist in Tabelle 16 dargestellt (Anhang II). Im Anhang II befindet sich ebenfalls eine Liste der Gene, die mit Hilfe des Arrays untersucht wurden (Tabelle 17). HT29 bzw. LT97 Zellen wurden für 24 h unter Verwendung von SFM (als Kontrolle) behandelt. GTE wurde in den Konzentrationen 2 bzw. 8  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalente eingesetzt. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen repräsentative cDNA Membranen eines Versuchs an HT29 Zellen bzw. an LT97 Zellen.

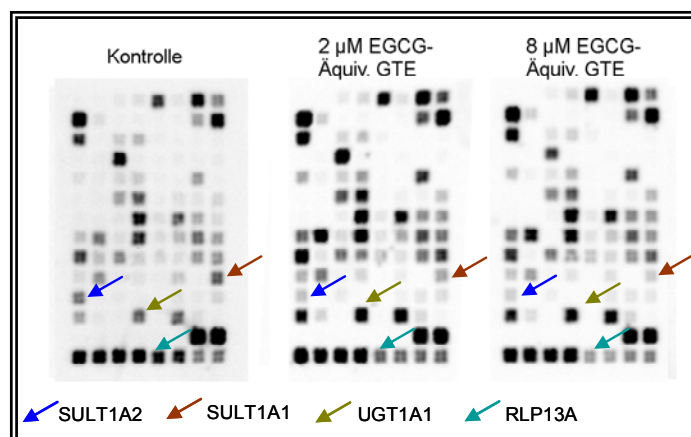


Abbildung 29: Repräsentative cDNA-Array-Membranen von HT29 Zellen

Die Zellen wurden 24 h mit GTE (2 bzw. 8  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalente) behandelt.

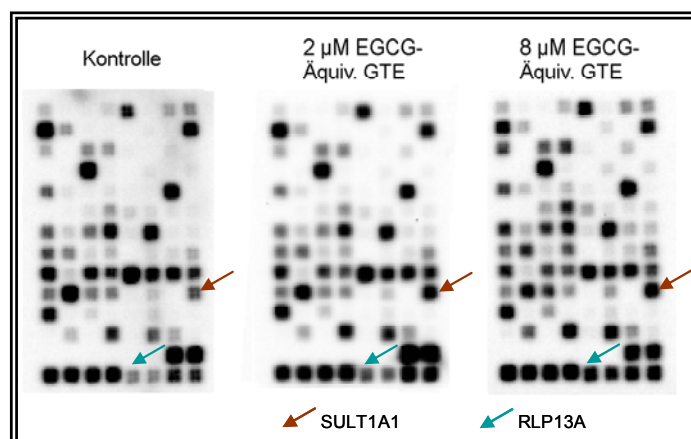


Abbildung 30: Repräsentative cDNA-Array-Membranen von LT97 Zellen

Die Zellen wurden 24 h mit GTE (2 bzw. 8  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalente) behandelt.

Nachdem die Membranen densitometrisch mit Hilfe einer Software (AIDA Microarray Suite) ausgewertet waren, erfolgte die Normalisierung der Rohwerte mittels Division durch den Median einer jeweiligen Membran. Als exprimiert galten die Gene, deren densitometrische Auswertung einen Wert ergab, der größer als der Wert der gemittelten Blanks inklusive der 3-fachen Standardabweichung war. Die normalisierten Rohdaten sind in sogenannten „single units“ (SU), die ein Maß für die Spot-Intensität darstellen, angegeben. Nach der Normalisierung wurden die Daten der Einzelversuche gemittelt und mit verschiedenen Methoden ausgewertet. Zum einen kam der sogenannte Scatterplot zum Einsatz. Hier wurden auf der X-Achse die Genexpressionsdaten der Kontrolle und auf der Y-Achse die Genexpressionsdaten der behandelten Zellen aufgetragen. Die Abbildungen 31 und 32 zeigen die Scatterplots der Auswertungen für HT29 Zellen, in den Abbildungen 33 und 34 sind die Scatterplots der Auswertungen für LT97 Zellen zu sehen. Anhand der Geradengleichung der jeweiligen Trendlinie und dem Verhältnis der Genexpression von unbehandelten zu behandelten Zellen wurde sowohl das 1,5-fache als auch das 2-fache Expressionsverhältnis (behandelte zu unbehandelte Werte) bestimmt. Alle Genexpressionswerte die höher bzw. niedriger als die zweifache Standardabweichung des Genexpressionsverhältnisses von unbehandelten zu behandelten Zellen sind, gelten als differenziell exprimiert. Die gestrichelten Linien verdeutlichen diese festgesetzte Grenze optisch.

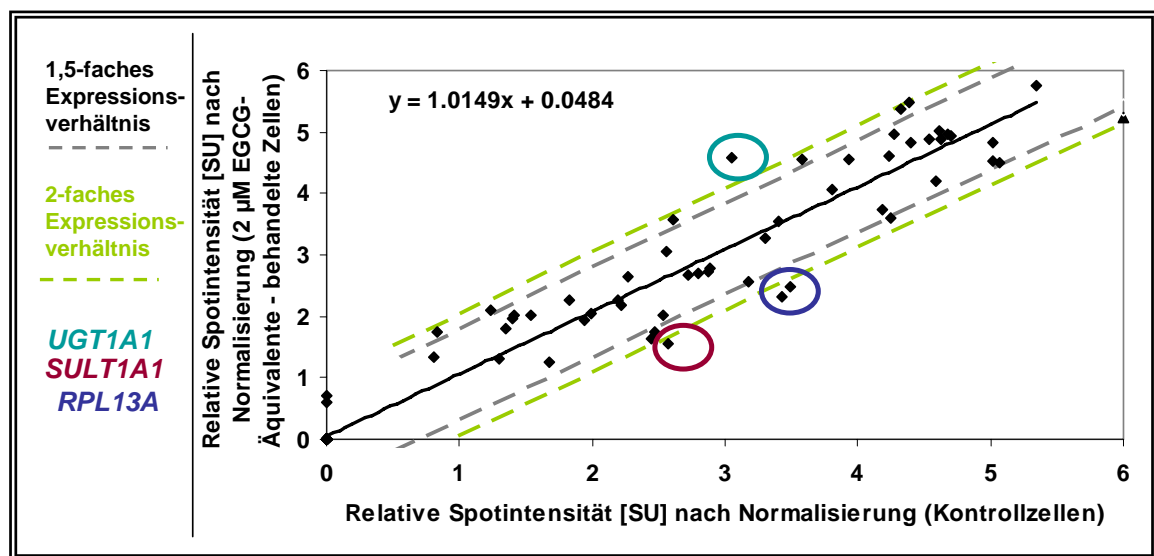


Abbildung 31: Differenzielle Genexpression in HT29 nach Behandlung mit 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE; Scatter Plot;

Die gestrichelten Linien markieren die gemittelten 1,5- (dunkelgrau) bzw. 2-fachen (hellgrau) Expressionsverhältnisse von unbehandelten und behandelten Zellen

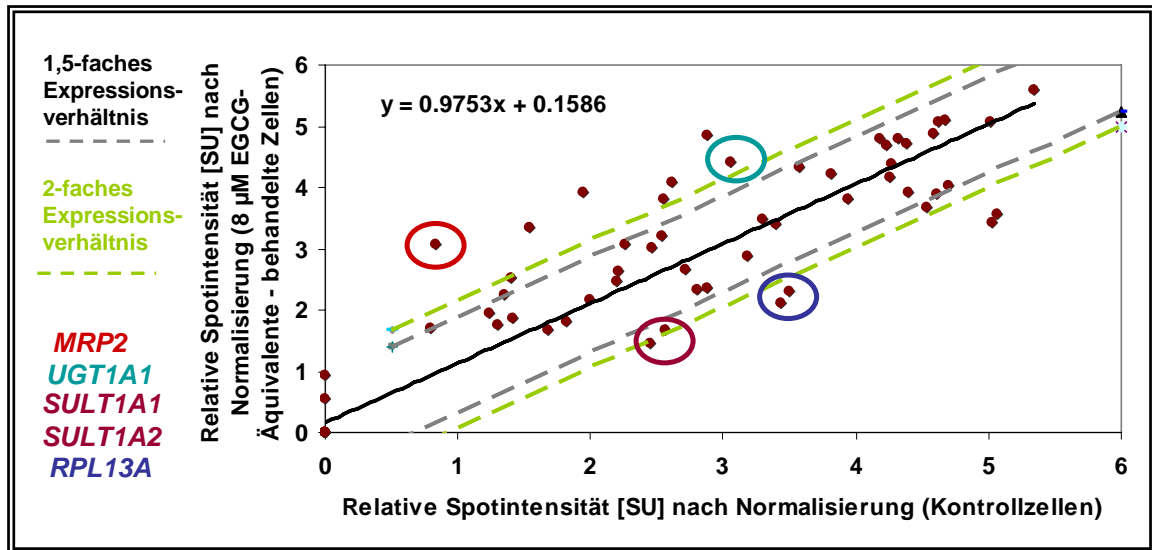


Abbildung 32: Differenzielle Genexpression in HT29 Zellen nach Behandlung mit 8 µM EGCG-Äquivalenten GTE; Scatter Plot

Die gestrichelten Linien markieren die gemittelten 1,5- (dunkelgrau) bzw. 2-fachen (grün) Expressionsverhältnisse von unbehandelten und behandelten Zellen

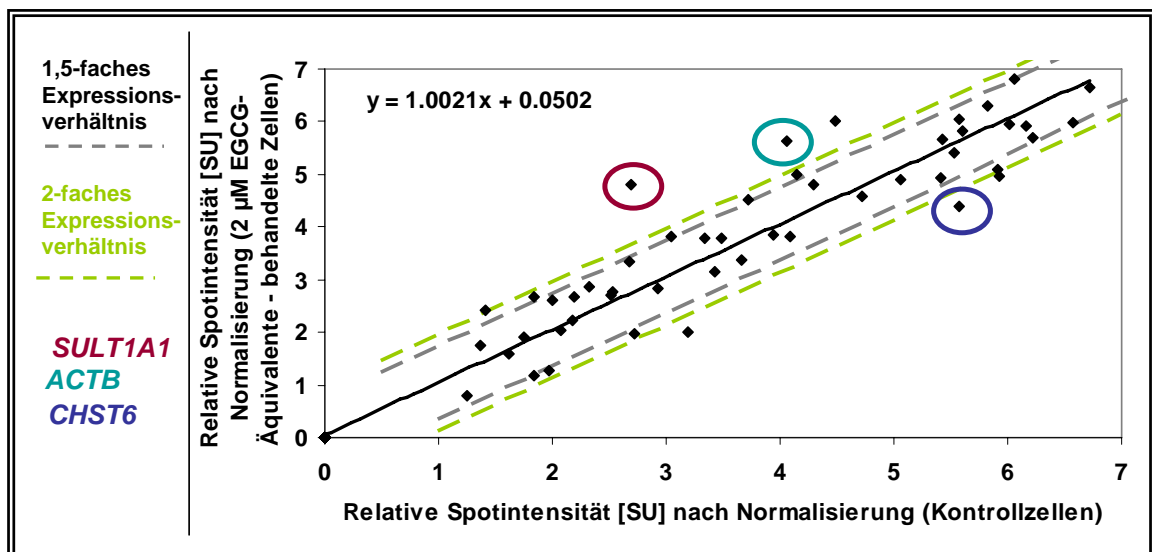


Abbildung 33: Differenzielle Genexpression in LT97 nach Behandlung mit 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE; Scatter Plot

Die gestrichelten Linien markieren die gemittelten 1,5- (dunkelgrau) bzw. 2-fachen (grün) Expressionsverhältnisse von unbehandelten und behandelten Zellen



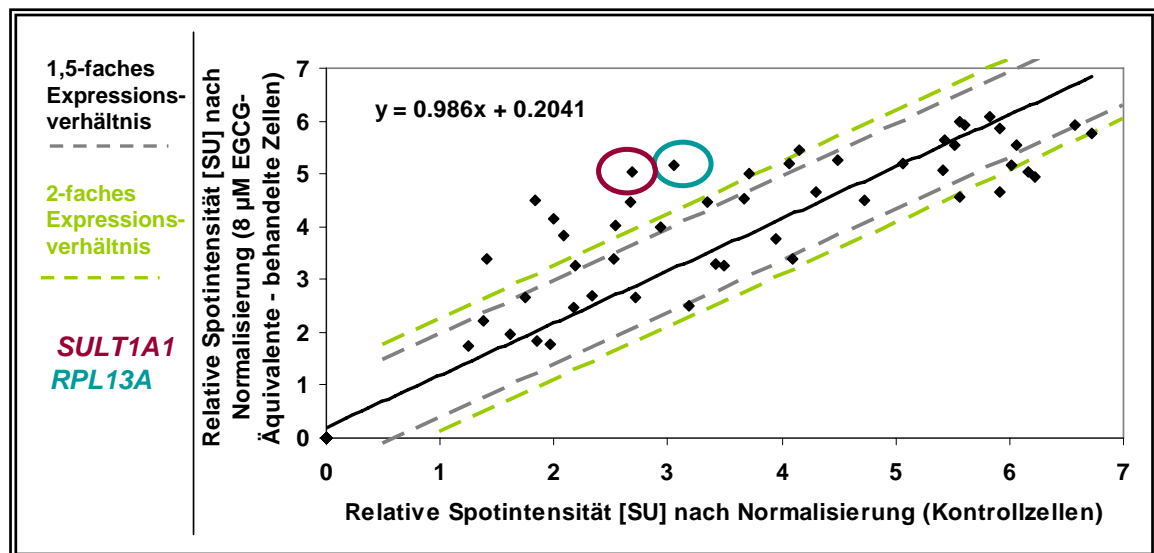


Abbildung 34: Differenzielle Genexpression in LT97 nach Behandlung mit 8 µM EGCG-Äquivalenten GTE; Scatter Plot

Die gestrichelten Linien markieren die gemittelten 1,5- (dunkelgrau) bzw. 2-fachen (grün) Expressionsverhältnisse von unbehandelten und behandelten Zellen

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung besteht in der Errechnung der sogenannten „Fold Change“. Dieser Wert gibt an, um wieviel die Expression eines Genes der behandelten Zellen sich von der Expression eines Genes der Kontrollzellen unterscheidet. Eine dritte Möglichkeit der Auswertung stellt schließlich die Berechnung des von Golub erstmals benutzten „Golub Kriterium“ dar (Golub *et al.*, 1999), das in der Literatur auch als „signal to noise ratio“ bezeichnet wird (Formel 1). Je höher der Zahlenwert des Golub-Kriteriums, umso sicherer ist ein Gen differenziell exprimiert.

$$GK = \left| \frac{MW(\text{behandelte Zellen}) - MW(\text{unbehandelte Zellen})}{SD(\text{behandelte Zellen}) + SD(\text{unbehandelte Zellen})} \right|$$

Formel 1: „signal to noise ratio“; Golubkriterium (nach (Golub *et al.*, 1999))

Beide Zelllinien wiesen hinsichtlich ihres Expressionsmusters Unterschiede auf. Abbildung 35 stellt dar, welche Gene in beiden Zelllinien exprimiert wurden. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass insgesamt 10 Gene in jeweils nur einer der beiden Zelllinien exprimiert wurden (HT29: SULT1A2, NNMT, LTA4H, CYP3A7, CYP3A5, CYP2F1; LT97: GSTM5, NAT1, HAT1, ABCB1).

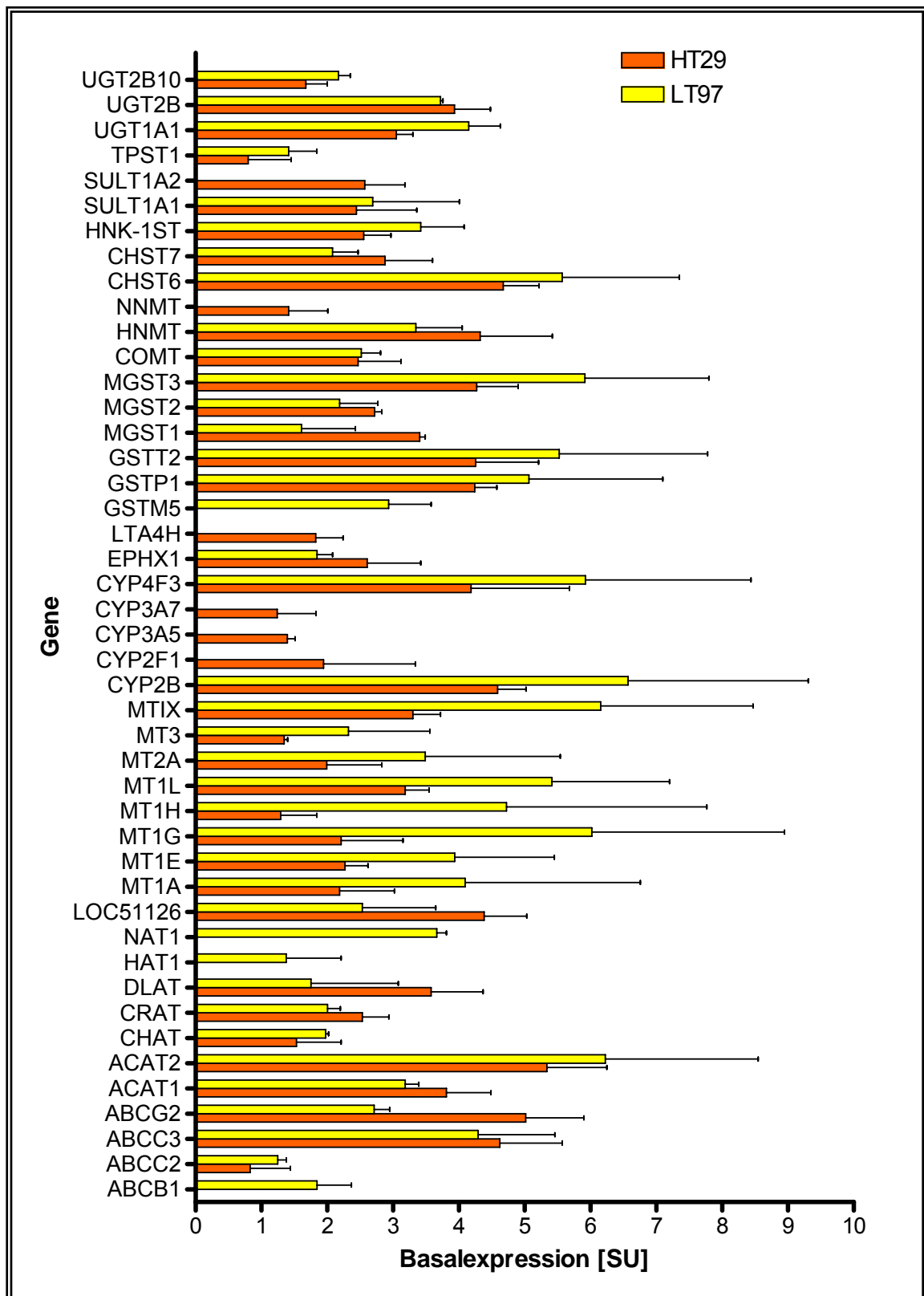


Abbildung 35: Basalexpression der Gene, die mittels cDNA Array in HT29 bzw. LT97 Zellen identifiziert werden konnten

$n=2$ ,  $MW \pm SEM$ ; als exprimiert galt ein Gen dann, wenn die densitometrische Auswertung der Spots mittels AIDA Software einen Wert  $> 1$  SU (Maß für die Spotintensität) aufwies.

Laut Auswertung der Scatterplots sind nur zwei von 45 Genen, die sichtbar exprimiert waren, nach Behandlung mit 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE in HT29 hoch reguliert; es sind die Gene des ABCC2 sowie der UGT1A1.

Nur ein Gen sind gemäß dieser Auswertung herunterreguliert, es ist das Gen der RPL 13A, das ribosomale Protein 13A, das auf dem cDNA Array als sogenanntes „Housekeeping Gene“ mitgeführt wird. Da eine statistische Auswertung aufgrund der kleinen Stichprobenzahl ( $n=2$ ) nicht möglich war, wurden alle drei bereits vorgestellten Möglichkeiten der Auswertung (Scatterplot, Fold Change und Golubkriterium) miteinander verglichen. Nur bei Übereinstimmung der Daten eines Gens in allen drei Auswertemethoden wurde angenommen, dass es sich bei dem Gen um ein differenziell exprimiertes Gen handelt. Hinsichtlich des Golubkriteriums wurde festgelegt, dass die zehn höchsten Werte je Intervention als positiv im Sinne der Erfüllung des Kriteriums galten. Tabelle 11 zeigt sowohl die durch 2  $\mu$ M bzw. 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente GTE in HT29 und LT97 Zellen induzierten und supprimierten Gene

*Tabelle 11: GTE-vermittelte Modulation der Genexpression in HT29 und LT97 Zellen*

*n.v. nicht verändert; + (eines), ++ (zwei), +++ (drei) der drei Kriterien (Fold Change, Scatter-Plot, Golub-Kriterium) positiv im Sinne einer Hochregulation- (eines), -- (zwei), --- (drei) der drei Kriterien positiv im Sinne einer Herunterregulation*

ZELLINIE	KONZ. GTE [ $\mu$ M EGCG-ÄQUIV.]	ABCC2	UGT1A1	EPHX1	CHST7	SULT1A1
HT29	2	+++	+++	+	n.v.	-
	8	+++	++	+++	+++	--
LT97	2	--	n.v.	+	n.v.	+++
	8	n.v.	n.v.	+++	+++	++
ZELLINIE	KONZ. GTE [ $\mu$ M EGCG-ÄQUIV.]	RPL13A	LOC5112	ACAT1	TPST1	CRAT
HT29	2	-	n.v.	n.v.	+	n.v.
	8	---	n.v.	n.v.	+	n.v.
LT97	2	n.v.	n.v.	---	++	+
	8	++	+++	-	+++	+++

Die Auswertung der Arrays ergab, dass in HT29 Zellen 5 und in LT97 Zellen 7 aller untersuchten Gene differenziell exprimiert waren, d.h. alle drei Auswertungsmethoden stimmten im Ergebnis bei diesen Genen überein. Betrachtet man die Gene hinsichtlich ihrer Funktionalität, lässt sich schon allein aufgrund der geringen Zahl an regulierten Genen feststellen, dass keine der funktionellen Gruppen generell einer Regulation durch GTE unterlag. Von den Fremdstofftransportern war nur das *ABCC2*, ein Protein aus der Familie der membranständigen ABC Membranpumpen, durch GTE beeinflusst. Eine Inkubation mit 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE führte in HT29 Zellen zu einem 3,7-fachen Anstieg der Expression von *ABCC2* auf Transkriptionsebene. In LT97 Zellen war das Gen schwächer exprimiert und veränderte sich durch die Behandlung mit GTE nicht. Insgesamt waren nur sehr wenige

Phase I Enzyme überhaupt exprimiert und wurden durch GTE nicht moduliert. Nur 2 Gene waren in beiden Zelllinien in gleicher Weise exprimiert: das Gen der Epoxidhydrolase 1 (*EPHX1*) und der *CHST7*, der Chondroitin-Sulfotransferase 2, wurden durch eine 24-stündige Behandlung mit 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE in beiden Zelllinien induziert (*EPHX1*: 1,6-fach induziert in HT29, 2,4-fach induziert in LT97; *CHST7*: 1,7-fach in HT29 induziert, 1,8-fach in LT97 induziert). Beide Gene gehören zu der funktionellen Gruppe der Phase II Enzyme, wie auch das durch GTE modulierte Gen der *LOC51126* (N-Acetyltransferase 5 (NAT5)) und das Gen der UDP-Glykosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) und das Gen der Sulfotransferase 1A1 (*SULT1A1*). Darüberhinaus wurde in HT29 Zellen das Housekeeping Gen *RPL13A* (ribosomales Protein 13A) durch GTE herunterreguliert.

### 4.3.2 Einfluss von GTE auf die Expression GSTP1 in humanen Kolonzelllinien

#### 4.3.2.1 mRNA-Expression der GSTP1 in humanen Kolonzelllinien

Abbildung 36 zeigt, dass die Behandlung mit 2  $\mu$ M und 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE in HT29 Zellen zu einer verminderten mRNA-Expression der *GSTP1* führt. Nach der 24-stündigen Behandlung mit GTE war die mRNA-Expression im Gegensatz zu der 48-stündigen Inkubation mit GTE noch nicht signifikant vermindert. Dabei ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen (2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE um das 1,4-fache vermindert; 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE um als 1,6-fache vermindert). In LT97 Zellen hingegen war die Expression der *GSTP1* sowohl nach 24-stündiger als auch nach 48-stündiger Inkubation mit GTE in den Konzentrationen von 2 bzw. 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten unverändert (Abbildung 37).

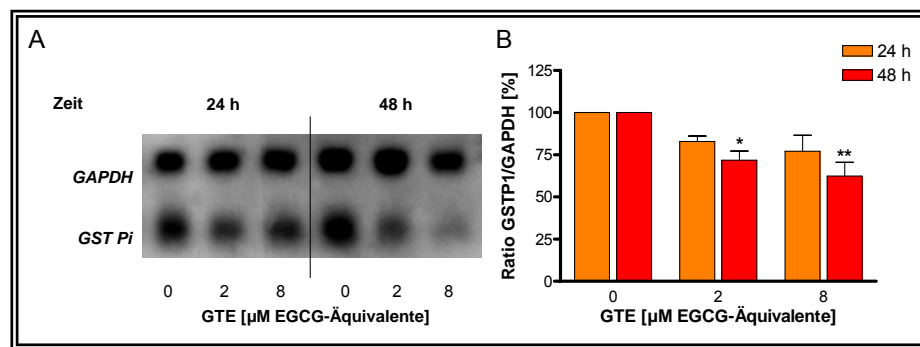


Abbildung 36: Northern Blot Analyse zur Identifizierung der *GSTP1* in HT29 Zellen nach Behandlung der Zellen mit GTE (24 h, 48 h)

A: Beispielblot; B: densitometrische Auswertung,  $n=4$ ,  $MW \pm SEM$ ,  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test

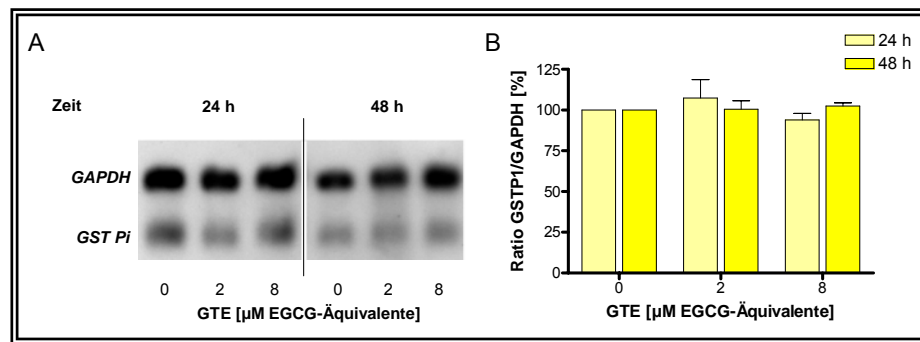


Abbildung 37: Northern Blot Analyse zur Identifizierung der GSTP1 in LT97 nach Behandlung der Zellen mit GTE (24 h, 48 h)

A: Beispielblot; B: densitometrische Auswertung,  $n=3$ ,  $MW \pm SEM$

## 4.4 Funktionelle Konsequenzen einer Grüntee catechinbehandlung in Kolonzellen

### 4.4.1 Modulation der GST-Enzymaktivität in humanen Kolonzelllinien

Die Behandlung der Zellen mit GTE zeigte in Abhängigkeit von der Zellart unterschiedliche Effekte. Eine 24-stündige Inkubation mit GTE induzierte in LT97 Zellen die GST-Aktivität dosisabhängig signifikant, in HT29 Zellen führte die Behandlung mit GTE zur einer signifikanten Abnahme der GST-Aktivität. Die GST-Aktivität in HT29 clone 19a Zellen wurde nicht verändert durch die Behandlung mit GTE (Abbildung 38).

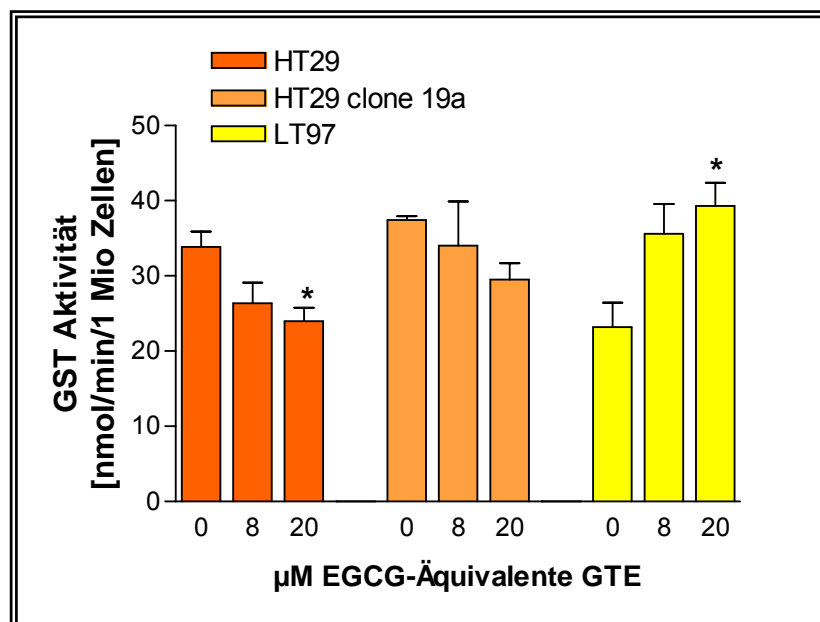


Abbildung 38: Modulation der GST-Aktivität auf der Basis der Zellzahl in LT97, HT29 clone 19a und HT29 Zellen durch GTE

Die Zellen wurden 24 h mit steigenden Konzentrationen GTE behandelt,  $MW \pm SEM$  ( $n = 4 - 7$ ); (\* $p < 0,05$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test)

#### 4.4.2 Einfluss von GTE und EGCG auf die UGT-Aktivität in den Kolonzelllinien LT97 und HT29

Die Verifizierung der cDNA-Array Ergebnisse, die gezeigt hatten, dass die Expression des UGT-Isoenzyms *1A1* in HT29 Zellen durch GTE induziert werden konnte, erfolgte mittels Enzymaktivitätsbestimmung. Als Substrat wurde 4-MU eingesetzt. Eine 24-stündige Inkubation mit GTE bzw. EGCG unter serumfreien Bedingungen führt zu einer dosisabhängigen signifikanten Erhöhung der UGT-Enzymaktivität führte (2,4-fache Erhöhung durch 20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) (Abbildung 39).

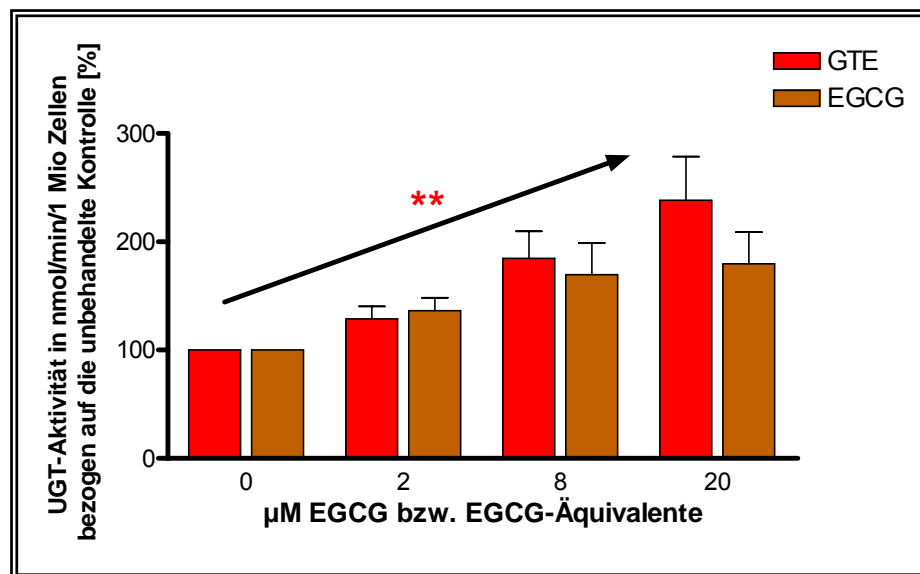


Abbildung 39: UGT-Aktivität in HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GTE bzw. EGCG unter serumfreien Bedingungen.

Die Enzymaktivität bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ,  $**p < 0,01$ , One way ANOVA mit Bonferroni Post test,  $n = 6$  (GTE),  $n = 3$  (EGCG)

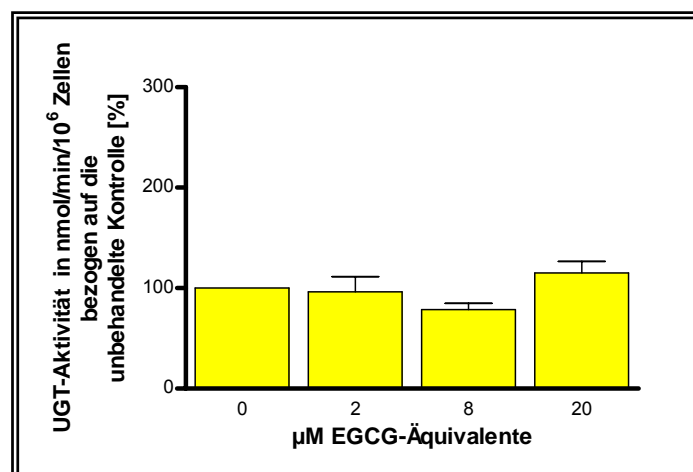
Eine Behandlung unter serumhaltigen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf die UGT-Aktivität. Tabelle 12 zeigt zusammenfassend die UGT-Aktivität in HT29 Zellen, die mit GTE bzw. EGCG in serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium inkubiert wurden. Aufgrund der starken Schwankungen in der Ausgangsfluoreszenz von Versuch zu Versuch wurden die Daten bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) dargestellt.

*Tabelle 12: Übersicht über die UGT-Aktivität in HT29 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GTE bzw. EGCG unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen.*

*Die Enzymaktivität ist in nmol/min/10<sup>6</sup> Zellen angegeben. MW ± SD; \*p<0,05, \*\*p<0,01, One-way-ANOVA mit Bonferoni Post Test*

BEHANDLUNG DER ZELLEN/ ANZAHL DER VERSUCHE		RELATIVE WERTE [%] ± SD	
Serumfreies Medium	GTE [µM EGCG-Äquivalente] n=4	0	100 ± 0
		2	128 ± 26
		8	<b>185 ± 50*</b>
		20	<b>238 ± 45**</b>
	EGCG [µM] n=3	0	100 ± 0
		2	136 ± 21
		8	170 ± 50
		20	178 ± 50
DMEM + 10 % FCS	GTE [µM EGCG-Äquivalente] n=3	0	100 ± 0
		2	113 ± 11
		8	90 ± 9
		20	86 ± 12
	EGCG [µM] n=3	0	100 ± 0
		2	96 ± 36
		8	79 ± 43
		20	81 ± 29

HT29 Zellen besitzen eine höhere basale UGT-Aktivität ( $0,4 \pm 0,1$  nmol/min/10<sup>6</sup> Zellen) als die LT97 Zellen ( $0,16 \pm 0,06$  nmol/min/10<sup>6</sup> Zellen). Die niedrige basale UGT-Aktivität war in LT97 Zellen durch GTE/EGCG nicht induzierbar (Abbildung 40).



*Abbildung 40: UGT-Aktivität in LT97 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GTE unter serumfreien Bedingungen.*

*Die Enzymaktivität bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle, MW ± SEM, \*p<0,05, \*\*p<0,01, One way ANOVA mit Bonferoni Post test, n = 6 (GTE), n = 3 (EGCG)*

#### **4.4.3 Wachstumsmodulierende Effekte an humanen Kolonzellen**

Ein vielfach in der Literatur beschriebener molekularer Mechanismus der Wirkung von Grüntee catechinen ist die Hemmung des Zellwachstums in transformierten Zellen. In dieser Arbeit wurden daher alle drei untersuchten Zelllinien auch hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens nach Behandlung mit GTE/EGCG untersucht. Nach Aussaat der Zellen in Multikavitätsplatten erfolgte für die HT29 und HT29 clone 19 a Zellen nach 48-stündiger Vorinkubation die Behandlung mit GTE bzw. EGCG unter serumfreien bzw. unter serumhaltigen Bedingungen (10 % FCS) bis zu einer Konzentration von 20  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten. LT97 Zellen wurden bei einer geschätzten Konfluenz von 70 % mit GTE bzw. EGCG unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Die Messung der Proliferation erfolgte mittels DNA-DAPI-Färbung (LT97, HT29 clone 19 a, HT29), BrdU-Assay (HT29 clone 19 a, HT29) und Bestimmung der Gesamtzellzahl über den Trypanblauausschlusstest (LT97, HT29). Die Untersuchung der LT97-Zellen erfolgte nicht mit dem BrdU-Assay, da die Zellen nicht genügend an den Kavitätsböden anhafteten und sich während der beim BrdU-Inkorporationsassay nötigen Waschschrte ablösten.

##### **4.4.3.1 Einfluss von GTE und EGCG auf das Wachstum von humanen Kolonzelllinien**

Die Untersuchung der MAPK Kaskaden auf Proteinebene sowie der IEGs auf mRNA-Ebene erfolgte an HT29 Zellen in allen Versuchen serumfrei unter Zugabe von GTE bzw. EGCG, um den induzierenden Effekt von FCS auf diese Signaltransduktionskaskaden ausschließen zu können. Abbildung 41 zeigt die Entwicklung des DNA-Gehalts als Maß für die Zellzahl in den drei untersuchten Zelllinien unter serumfreien Bedingungen nach 24-, 48- und 72- stündiger Behandlung mit GTE. Wie aus der Abbildung ersichtlich, wurde der DNA-Gehalt der drei untersuchten Zelllinien abhängig von der Inkubationsdauer mit GTE moduliert. Eine 24-stündige Inkubation führte zu einer Zunahme des DNA-Gehaltes von HT29 Zellen, die bei der Behandlung mit 8  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE signifikant war (um 44 % erhöht gegenüber der unbehandelten Kontrolle). 48 h bzw. 72 h nach Inkubationsbeginn mit GTE war hingegen eine zeit- und dosisabhängige Reduktion des DNA-Gehaltes in allen 3 Zelllinien zu beobachten. Die Abnahme des DNA-Gehaltes nach 72 h war dabei in der am stärksten transformierten Zelllinie HT29 am größten (Reduktion des DNA-Gehaltes um 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Abbildung 42 zeigt den Einfluss von EGCG unter serumfreien Bedingungen auf den DNA-Gehalt von LT97, HT29 clone 19 a und HT29 Zellen.



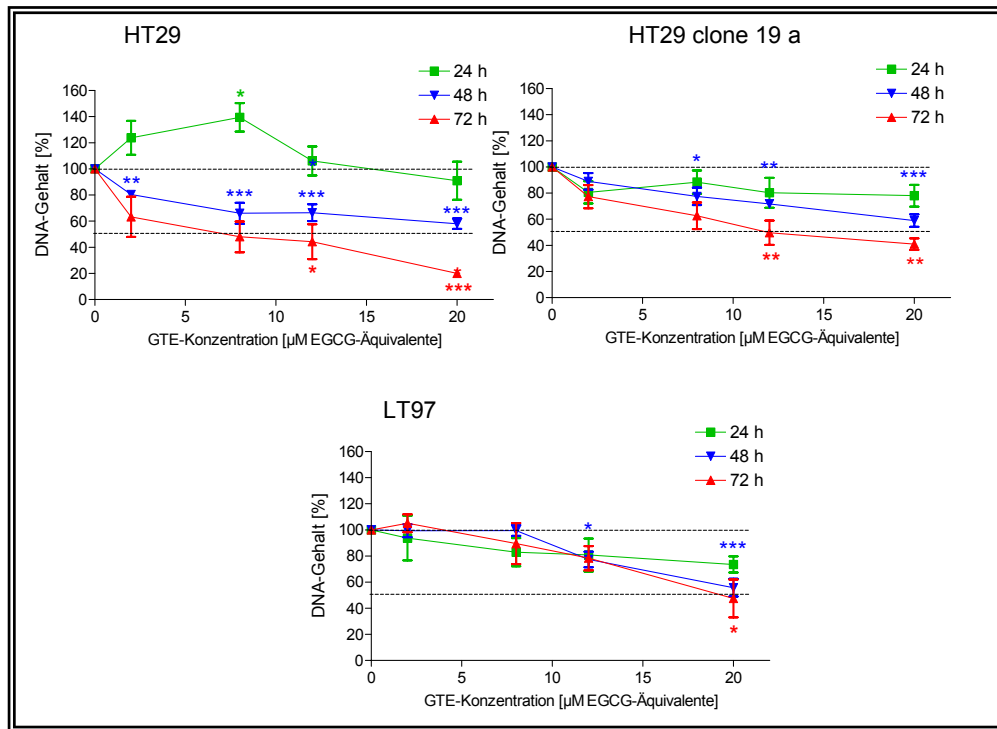


Abbildung 41: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in LT97, HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit GTE (bis 20 µM EGCG-Äquivalente) nach 24 h, 48 h und 72 h unter serumfreien Bedingungen, gemessen mittels DNA-DAPI-Färbung

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW ± SD, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 4$  (LT97),  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 5$  (HT29)

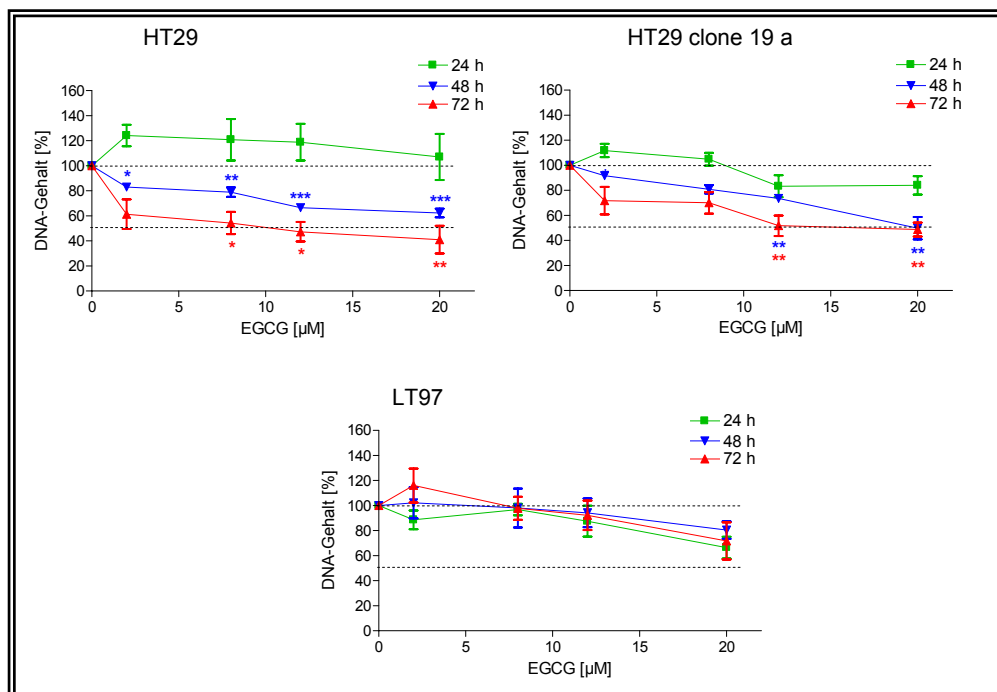


Abbildung 42: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in LT97, HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit EGCG (bis 20 µM) nach 24, 48 und 72 h unter serumfreien Bedingungen, gemessen mittels DNA-DAPI-Färbung

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW ± SD, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 4$  (LT97),  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 5$  (HT29)

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit EGCG war weder eine wachstumsfördernde noch eine wachstumshemmende Wirkung auf die Zellen zu beobachten. Eine Inkubation über einen längeren Zeitraum (48 h, 72 h) führte zu einer Wachstumshemmung in allen drei Zelllinien, die für HT29 clone 19 a und HT29 Zellen signifikant, aber in allen Fällen schwächer als die GTE-vermittelte Wachstumshemmung war.

Neben der Färbung mittels DAPI, die Aussagen über den DNA-Gehalt (und damit über das Wachstum) zulässt, wurde in HT29 und HT29 clone 19 a Zellen auch untersucht, welchen Einfluss GTE bzw. EGCG auf die DNA-Synthese (gemessen mittels BrdU-Inkorporation) der Zellen ausübt. Nach 24-stündiger Behandlung mit EGCG und GTE weder ein wachstumsfördernder noch ein wachstumshemmender Einfluss in HT29 und HT29 clone 19a Zellen zu beobachten (Abbildungen 43 und 44). Nach 48-stündiger Inkubation war die GTE-vermittelte Hemmung der DNA-Synthese in beiden Zelllinien signifikant; in den undifferenzierten HT29 Zellen reichten bereits 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalente aus, um die DNA-Synthese um 55 % zu reduzieren. Eine Inkubation mit GTE über 72 h erschien daher nicht sinnvoll.

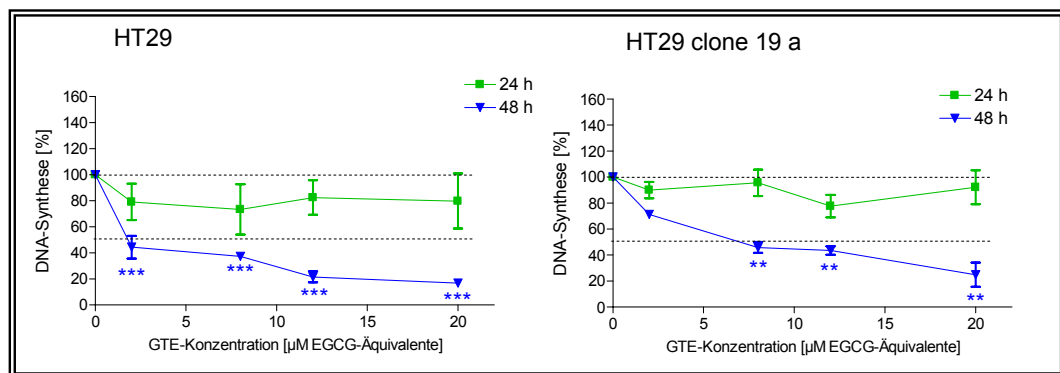


Abbildung 43: BrdU-Einbau als Maß für die DNA-Synthese in HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit GTE (bis 20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) nach 24 und 48h unter serumfreien Bedingungen

Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle (100 %) dargestellt; MW  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test;  $n = 4$

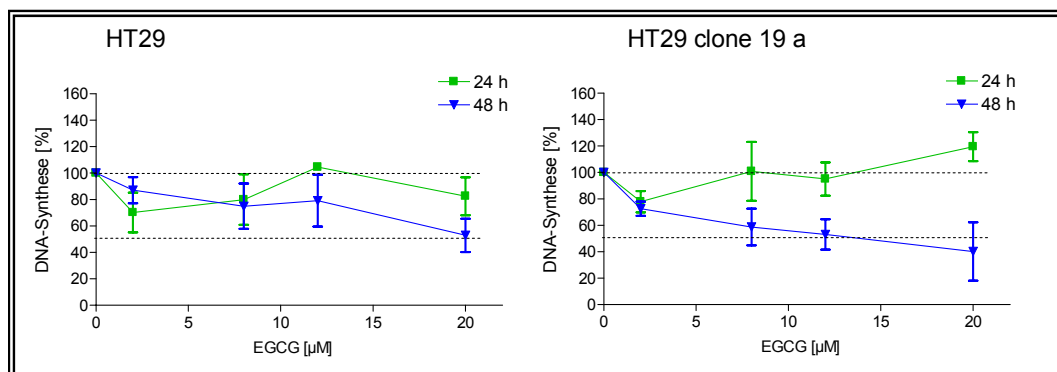


Abbildung 44: BrdU-Einbau als Maß für die DNA-Synthese in HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit EGCG (bis 20  $\mu$ M) nach 24 und 48h unter serumfreien Bedingungen

Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle (100 %) dargestellt (MW  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 4$ )

Aus Abbildung 44 wird ersichtlich, dass eine 24-stündige Inkubation mit EGCG keinen Einfluss auf die DNA-Synthese von HT29 clone 19a und HT29 Zellen hat. Eine 48-stündige Inkubation mit steigenden Konzentrationen an EGCG (bis 20  $\mu\text{M}$ ) löst hingegen eine dosisabhängige Hemmung der DNA-Synthese in beiden untersuchten Zelllinien aus, die allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant war.

Unter serumhaltigen Inkubationsbedingungen zeigte sich, dass GTE und EGCG in HT29 und HT29 clone 19 a Zellen keine generelle Wachstumsinhibierung bewirkten (Daten zusammengefasst in Tabelle 15).

Mit Hilfe des Trypanblauausschlusstests wurde überprüft, welchen Einfluss GTE auf die Zellviabilität von LT97 und HT29 Zellen hat. In LT97 Zellen war keine Änderung der Zellviabilität über 24 bzw. 48 h zu beobachten (Abbildung 45).

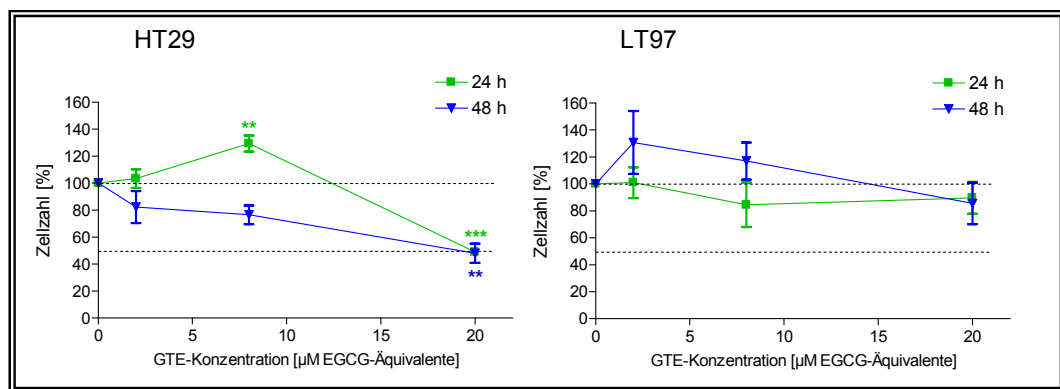


Abbildung 45: Gesamtzellzahl von LT97 und HT29 Zellen nach Inkubation mit GTE (2, 8, 20  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalente) nach 24 und 48 h unter serumfreien Bedingungen, gemessen mittels Trypanblau-Ausschluss-Test

Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle (100 %) dargestellt ( $MW \pm SD$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 3$  (LT97),  $n = 5$  (HT29))

In HT29 Zellen führte eine Behandlung mit GTE in der Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalenten über 24 h zu einer signifikanten Zunahme der Zellviabilität, eine Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  EGCG-Äquivalenten GTE führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität, die nach 48-stündiger Behandlung mit GTE auf gleichem Niveau wie nach 24-stündiger Behandlung mit GTE beobachtet werden konnte.

MW  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . One Way ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 5$  (LT97),  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 5$  (HT29)

MW  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . One Way ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 5$  (LT97),  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 5$  (HT29)

[illegible]

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zur Aufklärung der Mechanismen der Grüntee catechin-vermittelten Änderung des Zellwachstums sowie der Grüntee-vermittelten Modulation der beiden Phase-II-Enzyme UGT1A1 und GSTP1 beizutragen. Der Transkriptionsfaktor AP-1 und seine vorgeschalteten Signalwege standen dabei neben den funktionellen Konsequenzen im Vordergrund. Ein weiteres Augenmerk lag auf dem Vergleich von humanen Kolonzelllinien unterschiedlichen Transformationsstadiums. Die untersuchten Konzentrationen von Grüntee catechinen waren bewusst niedrig gewählt, um möglichst nah die Situation *in vivo* nach Grüntee konsum widerzuspiegeln.

### 5.1 Grüntee catechine beeinflussen die metabolische Aktivität und führen zur Aktivierung von MAP Kinasen in Kolonzellen

#### 5.1.1 Beeinflussung der metabolischen Aktivität von Kolonzellen durch Grüntee catechine

##### 5.1.1.1 Grüntee catechine beeinflussen die metabolische Aktivität von Kolonzellen

Die Frage, ob Grüntee catechine von Kolonzellen aufgenommen werden und intrazellulär wirken oder ob sie extrazellulär über die Bindung an Oberflächenrezeptoren wirken, ist bisher nicht hinreichend geklärt, auch wenn kürzlich gezeigt werden konnte, dass radioaktiv markiertes EGCG einerseits durch passive Diffusion in HT29 Zellen gelangen kann, andererseits aber auch membrangebunden vorkommt (Hong *et al.*, 2002).

Ein genereller Mechanismus der Zelle als Reaktion auf die Bindung von Liganden an Oberflächenrezeptoren ist der Efflux von Protonen aus der Zelle, der mit Hilfe der Zytosensor Mikrophysiometrie „online“ dokumentiert werden kann (Owicki und Parce, 1992; Hafner, 2000). Das Ausschleusen von Protonen aus der Zelle reflektiert auch die metabolische Aktivität der Zellen (Briviba *et al.*, 2001). Der Bestimmung des sehr empfindlichen Messparameters AR ist es zu verdanken, dass Unterschiede zwischen HT29 und HT29 clone 19a Zellen hinsichtlich der Reaktion auf Grüntee catechine unmittelbar nach Substanzzugabe erfasst werden konnten.

Die stark transformierte Zelllinie HT29 reagierte lediglich auf den komplexen GTE sowie auf EGCG mit einer kurzen vorübergehenden Erhöhung der AR, die dann noch während Substanzbehandlung unter das Basalniveau von 100 % sank. HT29 clone 19a Zellen reagierten mit Ausnahme von EC, das keinen Einfluss auf die AR in beiden Zelllinien hatte, auf jede Behandlung mit einem höheren Anstieg der AR im Vergleich zu ihrer Stammzelllinie. Ein

weiterer Unterschied der beiden Zelllinien bestand darin, dass die AR in HT29 clone 19a nach dem Erreichen der  $AR_{max}$  nur wenig absank und über die Inkubationszeit von 30 Minuten hinaus auf einem erhöhten Niveau blieb. Die Behandlung mit Grüntee catechinen führte in HT29 clone 19a Zellen demzufolge zu einer anhaltenden Steigerung der metabolischen Aktivität, in HT29 Zellen aber nur zu einer vorübergehenden Aktivierung.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen beiden Zelllinien könnte in der Expression von Rezeptoren liegen, an die Grüntee catechine binden können. Neben der aus der Literatur bekannten Interaktion von EGCG mit dem EGFR ist auch die Bindung von Grüntee catechinen an den erst kürzlich identifizierten membranständiger „EGCG-Rezeptor“ denkbar (Tachibana *et al.*, 2004). Dieser ist 67 kD groß, bisher ausschließlich als Laminin-Rezeptor bekannt und wird auch in Kolongewebe exprimiert (Stallmach *et al.*, 1999).

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität der beiden untersuchten Zelllinien in ihrer Reaktion auf GTE decken sich mit den von Kautenburger erhaltenen Ergebnissen, die die Differenzen in der Empfindlichkeit der beiden Zelllinien bereits beschrieben hatte. Eine 5-minütige Inkubation mit 4  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE führte in HT29 clone 19a Zellen zu einer mehr als doppelt so starken Aktivierung der MAP Kinase ERK wie in HT29 Zellen (Kautenburger, 2000). Eine vorübergehende Erhöhung der metabolischen Aktivität in HT29 Zellen reicht vermutlich nicht aus, um die Aktivierung der MAP Kinase ERK so zu bewirken, wie es eine anhaltende Erhöhung der metabolischen Aktivität kann. Es ist denkbar, dass die Unterschiede in den Reaktionen der beiden Zelllinien auf den Transformationsgrad der Zellen zurückzuführen sind. Je transformierter die Zelle, um so weniger sensitiv reagiert sie auf Stimulation „von außen“.

Obwohl die Menge des zugesetzten EGCGs im GTE der Menge entspricht, die bei der Behandlung mit EGCG zu den Zellen gegeben wurde (je 2  $\mu$ M), reagierten HT29 Zellen auf den komplexen GTE mit einer schnelleren Erhöhung der AR als durch EGCG alleine. Ein in Anlehnung an den GTE hergestelltes Gemisch aus Grüntee catechinen („synthetischer GTE“) hatte ebenso wie die Grüntee catechine EGC, EGC und EC (alle in der gleichen Konzentration wie in 2  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE vorhanden) alleine keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität. Ein Grund für die Unwirksamkeit des „synthetischen GTE“ in HT29 Zellen könnte demnach darin liegen, dass neben den sechs im synthetischen GTE untersuchten Katechinen im GTE noch andere, nicht näher charakterisierte Inhaltsstoffe enthalten sein müssen, die durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurden. Diese

Beobachtung wird auch durch die Tatsache untermauert, dass GTE auch in HT29 clone 19 a Zellen die AR stärker induzierte als die einzelnen Katechine bzw. der „synthetische GTE“. Obgleich im „synthetischen GTE“ die gleiche Menge an EGCG vorhanden war wie bei der Behandlung mit EGCG alleine, wurde die AR durch diesen „synthetischen GTE“ nur in HT29 clone 19a Zellen, nicht aber in HT29 Zellen erhöht. Die Wirkung des „synthetischen GTE“ war dabei in HT29 clone 19a Zellen vergleichbar mit der Wirkung von EGCG. Eine Erklärung für den fehlenden Effekt in HT29 Zellen ist, dass sich die Wirkung der Mischung der Grüntee catechine gegenseitig aufheben und so die Wirkung von EGCG überlagern könnte.

#### **5.1.1.2 GTE hemmt die Bindung von EGF an seinen Rezeptor in HT29 und HT29 clone 19a Zellen nicht**

Die Änderung der AR erfolgte in beiden Zelllinien unmittelbar nach der Substanzzugabe. Die Schnelligkeit, mit der die Zellen auf GTE/EGCG reagieren, legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine rezeptorvermittelte Wirkung der Grüntee catechine handeln könnte. Als ein postulierter Mechanismus der antikanzerogenen Wirkung von EGCG wird die Interaktion von EGCG mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) beschrieben, wobei EGCG die Bindung von EGF an seinen Rezeptor EGFR unterdrücken kann, was dafür spricht, dass EGCG und EGF um die gleichen Bindungsstellen konkurrieren (Liang *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Briviba *et al.*, die gezeigt hatten, dass das pflanzliche Anthocyan Cyanidin in Kombination mit EGF die EGF-induzierte AR in HT29 Zellen inhibieren konnte (Briviba *et al.*, 2001), reagierten beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien auf die Kombination von GTE und EGF mit einer sofortigen und schnellen Erhöhung der AR. Der von Briviba *et al.* für Cyanidin beschriebene Effekt konnte für GTE nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint es so zu sein, dass eine Art Synergismus von EGF und GTE vorliegt, der in einer höheren AR als durch EGF bzw. GTE resultiert. Die Tatsache, dass GTE die EGF-induzierte AR nicht senken kann, zeigt, dass GTE nicht über den EGFR in den beiden untersuchten Zelllinien wirkt.

Aufgrund der Schnelligkeit, mit der die Kombination aus EGF und GTE die AR in beiden Zelllinien beeinflusste, ist aber davon auszugehen, dass die Erhöhung der AR Rezeptor-Liganden-vermittelt ist und Grüntee catechine in der EGF-autokrinen Zelllinie HT29, abgesehen vom EGFR, an weitere Rezeptoren, wie den bereits erwähnten „EGCG-Rezeptor“ binden können.

### **5.1.1.3 Charakterisierung von LT97 Zellen mit Hilfe der Zytosensor Mikro-physiometrie**

In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass sich die Zytosensor Mikrophysiometrie auch für die Untersuchung der Adenomzelllinie LT97 eignet, allerdings waren höhere Konzentrationen von EGF im Vergleich zu den HT-Zellen nötig, um die metabolische Aktivität der Zellen zu stimulieren. Ein Grund für die größere Unempfindlichkeit von LT97 Zellen könnte in einer verminderten Anzahl ihrer EGF-Rezeptoren im Vergleich zu HT29 Zellen liegen, über die bisher keine Informationen vorliegen. Es ist allerdings bekannt, dass die Anwesenheit von EGF zum Wachstum dieser Zellen unabdingbar ist und dem Zellkulturmedium in ausreichender Konzentration zugesetzt werden muss (Marian, 2002).

### **5.1.2 Grüntee catechine beeinflussen die Aktivität der MAP Kinasen ERK, JNK und p38**

Im Abschnitt 5.1.1 wurde bereits auf die Wirkung von Grüntee catechinen auf die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und die metabolische Aktivität eingegangen. Ein genereller Mechanismus, als Antwort der Zellen auf die Bindung an Oberflächenrezeptoren, ist die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen durch die Auslösung von Signaltransduktionskaskaden (Lui *et al.*, 2002). Obwohl die Zytosensor Mikrophysiometrie das empfindlichste, im Rahmen der Arbeit vorgestellte Messsystem darstellt und sich die beiden HT-Zelllinien in ihrer Response auf EGF nicht unterscheiden, zeigten sich auch hinsichtlich der Aktivierung der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 erkennbare Unterschiede in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie.

#### **5.1.2.1 Einfluss von GTE und EGCG auf die Modulation der MAPK ERK**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Grüntee catechine die Aktivität der MAP Kinase ERK in Kolon Zelllinien induzieren. Alle untersuchten GTE/EGCG-Konzentrationen konnten die ERKs in HT29 Zellen mittelfristig (bis zu 8 h nach Substanzzugabe) und in HT29 clone 19 a Zellen langfristig (bis zu 48 h nach Substanzzugabe) aktivieren (Abbildungen 22 und 23). In der Adenomzelllinie LT97 hingegen konnte trotz hoher nachweisbarer Mengen an Gesamt-ERK keine ERK-Phosphorylierung detektiert werden (Abbildung 24).

Die Aktivierung der MAP Kinase ERK wird in der Literatur oftmals als ein Schritt gesehen, der die Expression von Genen erhöht, die zur Proliferation von Tumorzellen führen und die Differenzierung dieser Zellen verhindern (Chang und Karin, 2001; Kyriakis und Avruch, 2001; Johnson und Lapadat, 2002). Die Inhibierung der Aktivität der ERK wird demzufolge allgemein als antikanzerogener Mechanismus beschrieben (Yang *et al.*, 2002). Bei genauerer Betrachtung ist diese These allerdings nicht haltbar. In vielen untersuchten Zellmodellen



unterschiedlicher Gewebe konnten Grüntee catechine zwar die Aktivität der ERKs hemmen, allerdings nur, wenn diese zuvor durch Zellstressoren wie Phorbol-Ester oder UV-Licht induziert worden war (Katiyar *et al.*, 2001; Afaq *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2003).

Betrachtet man im Gegensatz dazu die Modulation der ERK ohne vorherige Aktivierung durch Zellstressoren, wird in der Literatur, abgesehen von drei Studien in Haut- und Fibrosarkomzellen, eine Aktivierung der ERK durch Grüntee catechine beschrieben (Literaturübersicht in Tabelle 18 im Anhang II). Insbesondere im Hinblick auf das Zielgewebe Darm zeigen die aus der Literatur bekannten, ausschließlich an HT29 Zellen durchgeführte Studien, dass EGCG die ERK-Aktivität induziert. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse belegen zum ersten Mal, dass die Inkubation mit einem komplexen GTE in niedrigen, physiologisch verfügbaren Konzentrationen in transformierten Darmzellen zu einer Induktion der ERK führt. Die Tatsache, dass in der Adenomzelllinie LT97 keine ERK-Induktion detektierbar war, zeigt, dass eine zell-spezifische Betrachtung der Mechanismen nötig ist. Es ist auch denkbar, dass die gewählten GTE/EGCG-Konzentrationen nicht ausreichten, um eine Aktivierung der ERK in dieser Zelllinie zu provozieren.

Eine Konsequenz der ERK-Aktivierung ist die Regulation von Transkriptionsfaktoren. Geeignete Kandidaten für die Regulation über ERKs sind IEGs wie c-fos. IEGs liegen normalerweise in geringer oder undetektierbarer Menge in der Zelle vor, bevor sie durch die Stimulation mit z.B. Wachstumsfaktoren induziert werden. Für eine Reihe von IEGs konnte gezeigt werden, dass ihre transkriptionelle Induktion innerhalb von Minuten nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren geschieht. Berücksichtigt man, dass die Dauer der ERK-Aktivierung entscheidend für die Protein-Stabilität des durch das Signal induzierten Transkriptionsfaktors c-fos ist, ist die anhaltende Aktivität der MAPK ERK bis zu 8 h in HT29 Zellen und bis zu 48 h in HT29 clone 19a Zellen ein erster Hinweis auf eine mögliche Grüntee catechin-vermittelte Wirkung auf IEGs (Murphy *et al.*, 2002).

Neben dem Einfluss auf Differenzierung und Wachstum wird die ERK-Aktivierung von mehreren Autoren auch mit einer Induktion der ARE/AP-1-vermittelten Genexpression von Phase II Enzymen in Zusammenhang gebracht (Yu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). Zudem wird eine Aktivierung der MAP Kinase ERK durch EGCG als Auslöser der stress-induzierten Apoptose diskutiert (Boldt *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Insbesondere bei den von Chen *et al.* untersuchten EGCG-Konzentrationen, die mehr als 100-fach über physiologisch verfügbaren EGCG-Konzentrationen liegen, scheint dies nicht verwunderlich, da davon

auszugehen ist, dass die von den Autoren gewählten EGCG-Konzentrationen eine generelle Stressantwort der Zelle provozieren, die zur Apoptose führt (Chen *et al.*, 2003).

#### **5.1.2.2 Einfluss von GTE und EGCG auf die Aktivierung der MAPK JNK**

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass Grüntee catechine die Aktivität der MAP Kinase JNK über die gesamte Dauer der Inkubation (bis zu 48 h) in Kolonzelllinien induzieren. Ein genereller Zusammenhang der JNK-Aktivierung in Abhängigkeit vom Transformationsgrad der Zellen war hier nicht erkennbar. Allerdings zeigte sich, dass nur die höchste eingesetzte GTE-Dosis (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) eine vergleichbar starke Induktion der JNK in HT29 und HT29 clone 19a Zellen bewirkte wie EGCG in der Konzentration von 8  $\mu$ M.

Wie bereits für die ERKs beschrieben, wurden die meisten Studien, die die Wirkmechanismen von Grüntee catechinen auf die MAPK Aktivität untersuchten, an stimulierten Zellen, d. h. an Zellen, die vor der Behandlung mit Grüntee catechinen bereits mit stressauslösenden Faktoren wie UV-Licht oder Phorbol ester behandelt wurden, durchgeführt. Über die Modulation ohne vorherige Aktivierung der JNK liegen bisher nur wenige Untersuchungen an humanen Zellen vor (Literaturübersicht in Tabelle 19 im Anhang II).

Der JNK-Signalweg ist ebenso wie der ERK-Signalweg in die Regulation von Wachstum, Transformation und programmiertem Zelltod (Apoptose) involviert (Ameyar *et al.*, 2003). JNK-vermittelten Signalen werden sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Wirkungen in Abhängigkeit von Zelltyp und Stimulus zugesprochen (Lin, 2003; Yu *et al.*, 2004). Einmal aktiviert, wandern JNKs in den Zellkern und erhöhen die transkriptionelle Aktivität des IEGs c-jun, das in der AP-1-vermittelten Regulation des Zellwachstums und der Genexpression eine Schlüsselposition innehat (Johnson und Lapadat, 2002).

#### **5.1.2.3 Einfluss von GTE und EGCG auf die Aktivierung der MAPK p38**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Dosen von GTE und EGCG in der Lage sind, die MAPK p38 zu aktivieren, wobei die höchste eingesetzte Konzentration des komplexen GTE (20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) in der differenzierteren Zelllinie HT29 clone 19a die stärkste Wirkung zeigte.

Die MAPK p38 wurde 1994 von Han *et al.* entdeckt (Han *et al.*, 1994). P38 ist involviert in Signaltransduktionswege, die die zelluläre Antwort auf Zytokine und Stress vermitteln. Ähnlich der MAPK JNK, wird die MAPK p38 durch zellulären Stress (osmotischer Schock,

inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und UV-Licht) aktiviert. Die Aktivierung der p38, die ähnlich wie bei den MAP Kinasen ERK und JNK die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren nach sich zieht, wird in der Literatur oftmals als eine generelle Stressantwort der Zelle definiert, die in Kolonkrebszellen u.a. mit der Induktion von Zell-tod/Apoptose einhergeht (Chan *et al.*, 2003).

In Anbetracht der aus der Literatur bekannten, verwendeten Konzentrationen von EGCG zur Aktivierung von p38 scheint eine Apoptose-Induktion als Stressantwort der untersuchten Zellen nicht verwunderlich (Literaturübersicht in Tabelle 20 im Anhang II). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivierung der p38 Kinase durch bereits geringe Konzentrationen GTE/EGCG könnte demnach ein erster Hinweis auf eine mögliche Induktion der Apoptose sein. Es ist allerdings genauso gut denkbar, dass eine Aktivierung der p38 Kinase eine differenzielle Genexpression nach sich zieht. So konnte beispielsweise Balasubramanian *et al.* an Keratinozyten zeigen, dass eine Behandlung mit EGCG zu einer gesteigerten Aktivität des Involucrin-Promoters führt, die Ras, p38 und AP-1 vermittelt war (Balasubramanian *et al.*, 2002).

## **5.2 GTE führt zur Modulation der Expression und Bindungsaktivität von AP-1 bzw. von seinen Untereinheiten**

Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 ist ein Modell, das nur bedingt Rückschlüsse auf die Wirkung von Grüntee catechinen, insbesondere in der Chemoprävention, zulässt. Nichtsdestotrotz wurde dieses Zellmodell zur Untersuchung der AP-1-Aktivität genutzt, da diese Zelllinie im Gegensatz zu LT97 Zellen eine gute Möglichkeit zur Transfektion mit dem TRE bot. (mündliche Angabe von Frau Prof. B. Marian, 2002).

### **5.2.1 GTE moduliert die mRNA-Expression von *c-fos* und hemmt die Bindungsaktivität von c-Fos an das TRE**

Die Untersuchung der GTE-vermittelten Modulation der AP-1 Untereinheiten der Fos-Familie erfolgte auf mRNA-Ebene anhand des am besten untersuchten Mitglieds dieser Familie, des *c-fos*. Die in zwei unterschiedlichen Kinetiken durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass eine Kurzzeitinkubation (bis zu 1 h) mit GTE bzw. EGCG *c-fos* induzierte (mit einem Maximum der mRNA-Expression von 30 min), während eine Behandlung mit GTE über 24 h zu einer tendenziellen Hemmung der *c-fos* mRNA führte. Die auf Transkriptionsebene erfasste GTE-vermittelte Hemmung der *c-fos* Expression nach 24-stündiger GTE-Behandlung korreliert mit der GTE-vermittelten, signifikant verminderten Bindungsaktivität von c-fos-Protein an das TRE in HT29 Zellen (nach 48 h).

Die für c-fos erhaltenen Ergebnisse bestätigen die in Abschnitt 5.1.2.1. diskutierte GTE-vermittelte Aktivierung der MAPK ERK. Neu synthetisiertes c-fos Protein hat eine Halbwertszeit von 30 - 45 Minuten, aber wenn dieses c-fos Protein durch die MAP Kinasen ERK und RSK phosphoryliert wird, verlängert sich die Halbwertszeit von c-fos auf wenigstens 2 h (Okazaki und Sagata, 1995; Chen *et al.*, 1996). Daraus folgt, dass das c-fos Protein bei schneller Inaktivierung der ERK zwar im Zellkern vorliegt, dort aber nicht phosphoryliert werden kann und daher degradiert. Auch Murphy *et al.* konnten zeigen, dass eine anhaltende Phosphorylierung der ERK in einer effizienten Phosphorylierung von c-fos resultiert und das c-fos Protein so für mehrere Stunden stabilisiert wird. Nur wenn es sich bei dem ERK-Signal also um ein anhaltendes Signal handelt, ist die Stabilität von c-fos groß genug, um zu einer Modulation der Expression von Genen zu führen, die ihre funktionelle Rolle in Differenzierung und Wachstum der Zellen haben. (Murphy *et al.*, 2002). Es ist wahrscheinlich, dass sowohl die Induktion der *c-fos* mRNA nach der GTE-Kurzzeitbehandlung (Kautenburger, 2000) als auch der nach 24 h GTE-Behandlung beobachtete Effekt indirekt, d.h. über die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren, wie im Falle von c-fos z.B. über das SRF, ERK-vermittelt ist (Whitmarsh *et al.*, 1995; Chai und Tarnawski, 2002).

Neben der ERK-vermittelten Regulation von c-fos auf Transkriptionsebene ist eine weitere Regulationsmöglichkeit denkbar, die eine Erklärung für den hemmenden Effekt der GTE-Langzeitinkubation (24 h) auf die *c-fos* mRNA sein könnte. Die vorhandene *c-fos* mRNA könnte durch GTE verstärkt abgebaut worden sein. Chen *et al.* haben diesen Effekta an Keratinozyten gezeigt, bei denen die zuvor durch UVB-Strahlung induzierte Expression von *c-fos* durch EGCG abgebaut worden war. Dieser Effekt wurde von den Autoren als Degradation der mRNA beschrieben. (Chen *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit beobachtete Grüntee catechin-vermittelte Hemmung der c-fos-Expression und -Bindungsaktivität in HT29 Zellen deckt sich mit den aus der Literatur bekannten Daten, die neben einem Brustkrebszellmodell auch in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 identifiziert wurden. Die Hemmung der Bindungsaktivität von c-fos ist demnach ein Mechanismus der Wirkung von Grüntee catechinen. Allerdings sollten die bisher aus der Literatur vorliegenden Daten kritisch bewertet werden, denn die eingesetzten EGCG-Konzentrationen waren z. T. 12,5- bzw. 50-fach höher als die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Grüntee catechin-Dosen (Masuda *et al.*, 2001; Sartippour *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2003).

Die Konsequenzen für die Zelle, die aus der beobachteten Änderung der *c-fos* mRNA-Expression sowie der c-fos-vermittelten AP-1-Bindungsaktivität resultieren, sind vielfältig und das Wissen darum der erst kürzlich entdeckten Beobachtung geschuldet, wonach die Rolle von AP-1 nicht nur vom Zelltyp abhängt, sondern auch von den am Heterodimer AP-1 beteiligten Untereinheiten (Shaulian und Karin, 2002; Eferl und Wagner, 2003). C-fos-Proteine sind in der Expression von Genen involviert, die mit der Angiogenese und der Invasion von malignen Tumoren assoziiert sind. Insgesamt wird c-fos, mehr als anderen AP-1-Untereinheiten, eher eine Rolle in späten Ereignissen während der Karzinogenese zugeschrieben (Reichmann *et al.*, 1992). So ist c-fos an der Induktion von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Dies sind Enzyme, die durch ihre proteolytische Aktivität die extrazelluläre Matrix der Zellen abbauen und so dafür sorgen, dass Krebszellen invasiv werden. (Tutton *et al.*, 2003). Die Hemmung der Expression sowie der Bindungsaktivität von c-fos kann daher als günstig für die Zellen angesehen werden. Kürzlich konnte aber auch gezeigt werden, dass das c-Fos-Protein in frühen Krebsstadien zu einer Runterregulierung von Tumor-Suppressor-Genen führen kann und somit eine antikarzinogene Wirkung aufweist. Eferl und Wagner sprechen in diesem Zusammenhang von einem „zweiseitigen Schwert“ der Wirkungen, die AP-1 in der Karzinogenese ausübt (Eferl und Wagner, 2003).

### **5.2.2 GTE induziert die mRNA-Expression von *c-jun* und steigert die Bindungsaktivität von c-jun an das TRE**

Eine Kurzzeitinkubation mit GTE bzw. EGCG induzierte *c-jun* direkt (mit einem Maximum der mRNA-Expression nach 60 min). Auch eine Behandlung mit GTE über 24 h resultierte in einer dosisabhängigen Induktion von *c-jun*. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Bindungsaktivität von c-jun-Protein an das TRE nach 48-stündiger GTE-Behandlung dosisabhängig gesteigert war. Diese Ergebnisse werden von der beobachteten Aktivierung der MAPK JNK durch GTE untermauert.

Eine Möglichkeit der Regulation von c-jun erfolgt über die Signalvermittlung von MAP Kinasen, wobei in erster Linie die MAPK JNK direkt sowie die MAPK p38 indirekt beteiligt sind, welche die Transkriptionsfaktoren (ATF-2, Elk1, SAP-1 und C/EBPs) phosphorylieren können. Diese Transkriptionsfaktoren können dann wiederum an Elemente im Promoter von c-jun binden und so die Transkription regulieren. Eine weitere Möglichkeit der Regulation von c-jun auf Transkriptionsebene erfolgt in Anwesenheit verschiedener Stimuli wie z.B. TPA, Insulin und EGF. Diese Art der Induktion wird in erster Linie über das c-Jun-ATF-2 Heterodimer vermittelt, das an das TRE im c-jun-Promoter bindet (Karin *et al.*, 1997). Her-

vorzuheben ist hier besonders, dass das c-Jun-Protein die Transkription der *c-Jun* mRNA positiv reguliert (Reddy und Mossman, 2002). AP-1-Heterodimere können auch an andere DNA-Bindungsstellen als das TRE binden (z.B. an das CRE, cAMP-response element), allerdings besitzen c-jun-Homo- und c-jun-Heterodimere mit Mitgliedern der c-fos-Familie die größte Affinität zum TRE (Eferl und Wagner, 2003).

Während c-jun in der Literatur vielfach als onkogen bezeichnet wird, gelten andere Mitglieder der JUN-Familie, wie z.B. JunB und JunD als anti-onkogene Transkriptionsfaktoren (Eferl und Wagner, 2003). Eine Studie von Suto et al. an HT29 Zellen zeigte, dass die durch Serum-Stimulation ausgelöste Erhöhung der AP-1-DNA-Bindungsaktivität und des Zellwachstums signifikant durch die Transfektion der Zellen mit einer dominant-negativen Mutante von c-jun erniedrigt werden konnten. Die Autoren interpretieren diesen Gentransfer als eine neue therapeutische Strategie gegen kolorektale Krebserkrankungen (Suto *et al.*, 2004). Es wäre im Sinne der Chemoprävention daher wünschenswert, die Bildung bzw. Bindung von c-jun zu unterdrücken. Allerdings ist auch vorstellbar, dass AP-1 unter Beteiligung von c-jun zur Induktion der Expression von Entgiftungsenzymen beiträgt. Die Grüntee catechin-vermittelte Erhöhung der Expression sowie der Bindungsaktivität von c-jun muss sich daher nicht generell ungünstig auf die Zelle auswirken.

### **5.2.3 Grüntee catechine induzieren die Bindungsaktivität von FosB an das TRE in HT29 Zellen**

Im Falle von FosB war bereits in unbehandelten Zellen (Mediumkontrolle) im Vergleich zu den anderen untersuchten AP-1-Untereinheiten eine hohe Bindungsaktivität zu verzeichnen, die durch eine 24-stündige Inkubation mit GTE dosisabhängig signifikant gesteigert werden konnte. Abgesehen von regulatorischen Eigenschaften im Hypothalamus und im Kortex konnte eine FosB-spezifische Funktion in humanem Gewebe bisher nicht ermittelt werden und auch die Rolle von FosB in der Karzinogenese ist unklar. FosB ist in Brusttumorgewebe herunterreguliert, in gesundem Gewebe der Brust aber hoch exprimiert. Die Expression von FosB scheint notwendig für die normale Proliferation und Differenzierung von Brustepithelzellen zu sein (Milde-Langosch *et al.*, 2003). FosB ist beteiligt an der durch Calcium ausgelösten, AP-1-vermittelten gesteigerten Genexpression von Involucrin, das als Marker für die Differenzierung von Keratinozyten gilt (Ng *et al.*, 2000).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg der FosB-AP-1-Bindungsaktivität durch GTE bestätigt die bereits in Keratinocyten gezeigte Fähigkeit von EGCG, die Expression von FosB zu steigern (Balasubramanian *et al.*, 2002). Zum anderen ist der Anstieg ein Hinweis

auf eine mögliche differenzielle AP-1-vermittelte Genexpression von Genen, die mit einer Re-Differenzierung der Tumorzellen assoziiert sein könnten.

#### **5.2.4 GTE und EGCG erhöhen die AP-1-Bindungsaktivität**

Die mit Hilfe eines Reporter-gen-Assay in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an HT29 Zellen belegen, dass die Inkubation mit EGCG und GTE zu einer signifikanten Erhöhung der Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE führt. Die Hypothese, dass Flavonoide die Bindungsaktivität von AP-1 modulieren, kann damit durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gestützt werden. Aus den bereits diskutierten Ergebnissen geht hervor, dass an der gestiegenen AP-1-Bindungsaktivität die AP-1-Untereinheiten c-jun sowie FosB, nicht aber c-fos beteiligt sind.

In vielen Studien wird eine durch sekundäre Pflanzenstoffe ausgelöste Hemmung des als Tumorpromoter bezeichneten Transkriptionsfaktors AP-1 als protektiver Mechanismus dieser Pflanzeninhaltsstoffe angesehen (zusammenfassende Übersicht bei (Bode und Dong, 2003). Vielfach spielen dabei Untersuchungen eine Rolle, in denen gezeigt wird, dass EGCG die Bindungsaktivität von AP-1, die zuvor durch Tumorpromotoren induziert wurde, hemmen konnte. So zeigt beispielsweise eine Studie von Okabe et al., dass eine Vorinkubation mit EGCG (50  $\mu$ M - 500  $\mu$ M) in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie die Bindungsaktivität von Okadeinsäure-induziertem AP-1 in humanen Magenkrebszellen hemmen kann (Okabe *et al.*, 1999). Xenobiotika, aber auch Antioxidantien und so auch viele sekundäre Pflanzenstoffe, können über definierte Signaltransduktionsmechanismen wirken, die über die Bindung an responsive Elemente im Genpromoter zu einer veränderten Genexpression führen. Nach der Aktivierung von MAP Kinasen kommt es durch die Aktivierung des AP-1 zur Bindung an das TRE oder andere responsive Elemente wie am ARE. Der u.a. in Zitrusfrüchten vorkommende Perillyl-Alkohol, ein Monoterpen, induziert in der humanen Brustkrebszelllinie T47D-C4-2W über die Phosphorylierung der JNK die Expression von c-jun und c-fos, die in einer gesteigerten AP-1-Aktivität resultierte. Die Autoren folgern daraus, dass die Modulation von AP-1 in einer veränderten Genexpression resultieren könnte (Satomi *et al.*, 1999). Balasubramanian et al. zeigen, dass ein Grünteeextrakt über die MAPK p38 und AP-1 (Fra-1, JunD) die Expression von Involucrin in humanen Keratinozyten induzieren konnte (Balasubramanian *et al.*, 2002).

### **5.3 GTE wirkt auf die Expression von Fremdstoffmetabolismus-relevanten Enzymen in Kolonzellen**

#### **5.3.1 Differenzielle Genexpression in Kolonzellen - cDNA-Array-Screening**

##### **5.3.1.1 ABCC2 – ATP binding cassette transporter oder Multidrug resistant protein 2 (MRP2)**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die basale Expression des *MRP2* Gen in LT97 Zellen höher war als in der stärker transformierten Zelllinie HT29. Die Behandlung mit GTE führte in HT29 Zellen zu einer 3,7-fachen Induktion der MRP2 Expression. In LT97 Zellen hingegen veränderte sich die MRP2-Expression durch die Behandlung mit GTE nicht.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse demonstrieren, dass Grüntee catechine die Expression von MRP2 induzieren können. In weiterführenden Studien muss nun belegt werden, ob der auf mRNA-Ebene beobachtete Effekt auch auf Proteinebene gefunden werden kann und inwieweit dieser Effekt zelltypabhängig Konsequenzen für die Bioverfügbarkeit von EGCG hat.

Der Auswärtstransport von Zytostatika aus Tumorzellen in den Extrazellularraum durch überexprimierte ATP-abhängige Membranpumpen gilt als ein wichtiger molekularer Mechanismus der Resistenzbildung gegenüber Zytostatika und wird als Mehrfachresistenz (engl. „multidrug resistance“) bezeichnet. Bei der MRP2 oder ABCC2 handelt es sich um eine dieser Membranpumpen, die apikal in der Zelle lokalisiert ist und den Transport von unkonjugierten amphiphilen Anionen und von hydrophilen, mit Glutathione, Glucuronat oder Sulfat konjugierten Substanzen vermittelt (Konig *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass MRP2 an der bilären Exkretion von heterozyklischen Aminen wie dem PhIP aus dem Gastrointestinaltrakt beteiligt ist (Dietrich *et al.*, 2001). Effluxpumpen vom MRP-Typ können aber nicht nur den Transport von Zytostatika aus Zellen bewirken, sondern auch die Bioverfügbarkeit von Grüntee catechinen durch den Abtransport aus der Zelle limitieren (Vaidyanathan und Walle, 2001).

Es ist bekannt, dass Antioxidantien wie Quercetin und t-Butylhydroquinon (tBHQ) die Induktion von *MRP2* in Caco-2 Zellen bewirken können und gleichzeitig die UGT1A6 induzieren (Bock *et al.*, 2000; Kauffmann *et al.*, 2002). Der Induktionsmechanismus ist Gegenstand aktueller Forschung. Die im Promoter des *MRP2* Gens identifizierte ARE-like Sequenz konnte aber nicht für die Induktion des *MRP2* in HepG2 Zellen durch tBHQ verantwortlich gemacht werden (Kauffmann *et al.*, 2002). Auch die durch Clotrimazol beobachtete Indukti-



on und die damit verbundene Annahme, dass der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) im Promoter des *MRP2* Gens verantwortlich für die Induktion ist, bestätigte sich nicht (Kauffmann *et al.*, 2002).

#### **5.3.1.2 EPHX1 – mikrosomale Epoxid Hydrolase 1**

Die Expression des *EPHX1* Gens auf Transkriptionsebene wurde durch die höhere der beiden untersuchten GTE-Konzentrationen (8  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) in beiden untersuchten Zelllinien induziert. EPHX1 ist ein Xenobiotika-metabolisierendes Phase II Enzym, das reaktive Epoxide zu wasserlöslicheren Dihydrodiol-Verbindungen entgiftet. Die Induktion der EPHX1 durch GTE ist ein chemoprotektiver Mechanismus, auch wenn die gesteigerte Expression in HT29 Zellen im Hinblick auf den Transformationsgrad der Zellen nicht uneingeschränkt positiv bewertet werden kann.

#### **5.3.1.3 CHST7 – carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7 (Chondroitin 6-Sulfotransferase 2; C6ST2)**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Grüntee catechine die Expression der CHST7 in beiden untersuchten Zelllinien induzierten. Die Sulfotransferase CHST7, wurde im Jahr 2000 kloniert und in verschiedenen humanen Geweben identifiziert. Es handelt sich bei der CHST7 um eine neue Chondroitin 6-O-Sulfotransferase, die Sulfate in N-Acetylgalaktosamine umwandelt. CHST7 war bisher in humanem Kolongewebe nicht nachweisbar (Kitagawa *et al.*, 2000). Da über die Bedeutung dieses Enzyms im Kolon bisher keine Daten aus der Literatur vorliegen, ist es nicht möglich, die Relevanz dieses Gens zu diskutieren. Die vorliegende Arbeit belegt aber, dass das Gen auch in Kolonzelllinien exprimiert wird und darüber hinaus durch GTE induzierbar ist.

#### **5.3.1.4 RPL13A – Ribosomales Protein L 13A**

RPL13A wurde auf dem cDNA Array als eines von vier sogenannten „Housekeeping Genen“ mitgeführt. Bei den „Housekeeping Genen“ handelt es sich um proteinkodierende Gene, die in der Zelle konstitutiv exprimiert werden und keiner gewebe- oder stadienspezifischen Regulation unterliegen. Obwohl erst kürzlich gezeigt werden konnte, dass das RPL13A im Vergleich zu dem vielfach in der Normalisierung von Arraydaten eingesetzten Gen der GAPDH stabil exprimiert wird (Jesnowski *et al.*, 2002), zeigen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen, durch Division durch den Median normalisierten, Daten, dass eine GTE-Inkubation von HT29 Zellen zu einer Herunterregulation des RPL13A auf Transkriptionsebene führte. Der Einsatz von „Housekeeping-Genen“ zur Normalisierung von Expressionsdaten ist demzufolge kritisch zu betrachten und die vorliegenden Daten sprechen für die Suche nach Alternativen, wie sie die Division durch den Median einer jeweiligen Membran darstellt.

Werden „Housekeeping-Gene“ zur Normalisierung von Daten, die beispielsweise mittels Northern Blot-Technik oder Realtime-PCR-Technik erhalten wurden, herangezogen, so sind diese immer zell- und inkubationsspezifisch auszuwählen.

#### **5.3.1.5 SULT1A1 – Sulfotransferase 1A1**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der SULT1A1 und 1A2 durch GTE in der stärker transformierten Zelllinie HT29 tendenziell gehemmt. In der Adenomzelllinie LT97 war hingegen eine Induktion der Genexpression der SULT1A1 zu verzeichnen. Sulfotransferasen katalysieren die Übertragung der Sulfonyl-Gruppe vom Co-Substrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf nukleophile Substrate, zu denen viele Xenobiotika, Hormone und Neurotransmitter zählen (Marquard und Schäfer, 2003). Die Sulfonylierung stellt einen für die Zelle wichtigen Mechanismus der Detoxifizierung von Substraten dar, die bereits in geringen Konzentrationen toxische Wirkungen entfalten können. Demgegenüber stehen einige Substanzklassen, die durch die Sulfonylierung erst zu genotoxischen Verbindungen aktiviert werden. Zu diesen Substanzklassen gehören unter anderem die beim Braten von Fleisch entstehenden heterozyklischen Amine (Marquard und Schäfer, 2003). Diese Tatsache hat dazu geführt, dass auch die Hemmung der SULT1A1 als chemoprotektiver Mechanismus angesehen wird. (Isozaki und Tamura, 2001). Demzufolge ist die GTE-vermittelte Hemmung der SULTs zwar aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen wünschenswert, andererseits konnte die Hemmung in der vorliegenden Arbeit nur in der Karzinomzelllinie nachgewiesen werden, deren Protektion nur bedingt wünschenswert ist. Im Falle der LT97 Zellen ist es möglich, dass die Zellen mit einer verstärkten Expression der SULTs reagieren, um Grüntee catechine effektiv aus der Zelle zu eliminieren. Gestützt wird diese Hypothese durch eine Studie von Vaidyanathan et al., die zeigten, dass das Grüntee catechin EC durch die beiden im Intestinum exprimierten Enzyme SULT1A1 und SULT1A3 sulfatiert wird (Vaidyanathan und Walle, 2002). Über die Metabolisierung von EGCG, dem Hauptcatechin aus Grüntee, durch Sulfotransferasen ist zwar bisher nichts bekannt, bedingt durch die strukturelle Ähnlichkeit der Flavanole ist es aber durchaus möglich, dass auch EGCG der Biotransformation durch Sulfotransferasen unterliegt und daher der Zelle nur begrenzt zur Verfügung steht.

#### **5.3.1.6 LOC51126-N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, *S. cerevisiae*)**

Die Genexpression der *NAT5* konnte in LT97 durch die Inkubation mit 8 µM EGCG-Äquivalenten GTE induziert werden. Über das Gen der LOC51126 (*NAT5*) weiss man bisher lediglich, dass es auf Chromosom 20 lokalisiert ist (Deloukas *et al.*, 2001). Aufgrund der Ähnlichkeit des Gens mit anderen N-Acetyltransferasen ist anzunehmen, dass auch die

NAT5 die gleiche Funktion wie die beiden bekannten Vertreter der N-Acetyltransferasen, NAT1 und NAT2, hat. N-Acetyltransferasen katalysieren die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf Amine und Hydroxylamine (Marquard und Schäfer, 2003). Da sich NAT1 und NAT2 signifikant in ihrer Substratspezifität unterscheiden, ist es möglich, dass die NAT5 auch einer solchen Substratspezifität unterliegt. Da die N-Acetyltransferasen wie die SULTs auch eine Rolle in der Aktivierung von aromatischen Aminen und heterozyklischen Aminen zu genotoxischen Verbindungen spielen können, ist die Induktion der Genexpression unter Umständen als ungünstig für die Zellen zu bewerten.

### **5.3.2 Grüntee catechine modulieren die Expression der *GSTP1* mRNA sowie die GST-Aktivität in Kolonzellen**

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Messung der Expression der GSTP1 in Abhängigkeit der angewandten Methode stand. Anhand der Makroarrays war in keiner der beiden untersuchten Zelllinien eine GTE-vermittelte differenzielle Expression von GSTP1 erkennbar. Untersuchungen im Northern Blot zeigten dagegen, dass eine 24-stündige Behandlung mit GTE in der Kolontumorzelllinie HT29 die mRNA-Expression der GSTP1 tendenziell verminderte. Eine längerfristige GTE-Inkubation (48 h) führte zu einer signifikanten Abnahme der *GSTP1* mRNA-Gehalte in HT29 Zellen. Diese Inhibierung ist nicht auf eine unspezifische Hemmung der RNA-Synthese zurückzuführen, da die Behandlung mit GTE die Expression der GAPDH mRNA nicht signifikant veränderte. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen kann damit erklärt werden, dass der Makroarray zwar eine geeignete Methode zum Screening von Genen darstellt; es ist allerdings sinnvoll, die gewonnenen Ergebnisse unter Zuhilfenahme einer weiteren Methode abzusichern. Zur weiteren Verifizierung erfolgte daher die Messung der GST-Gesamtaktivität, die aufgrund der hohen GSTP-Gehalte im Kolon als Maß für die GSTP-Aktivität angesehen werden kann. Die GST-Gesamtaktivität nach einer Behandlung von HT29 Zellen mit GTE korrelierte positiv mit den auf Transkriptionsebene erhaltenen Ergebnissen unter Verwendung des Northern Blot. Nach 24-stündiger GTE-Behandlung war die GST-Gesamtaktivität in HT29 Zellen signifikant reduziert. In der re-differenzierten Zelllinie HT29 clone 19a bewirkte die Behandlung mit GTE keine Änderung der GST-Aktivität. In LT97 Zellen hatte eine 24-stündige GTE-Inkubation zwar keinen Einfluss auf die *GSTP1* mRNA-Expression, die GST-Aktivität konnte durch die GTE-Inkubation in LT97 Zellen allerdings signifikant um das 1,7-fache induziert werden.

GSTs bilden im menschlichen Körper ein wichtiges Entgiftungssystem, wobei die Entgiftungskapazität der Zellen entscheidend durch das Spektrum der einzelnen GST-Isoenzyme und die Höhe der Expression beeinflusst wird. Sind die GST-Gehalte in einer Zelle hoch, ist diese prinzipiell in der Lage, exogene und endogen gebildete Karzinogene effektiv zu entgiften und somit das Gewebe vor DNA-Schäden zu schützen (Hayes und Pulford, 1995; Ketterer, 1998). Eine Ausnahme bildet die seltene Möglichkeit der Giftung von Prokanzerogenen durch GSTs, wie im Falle der GSTT für das Substrat Dichlormethan beschrieben (Sherratt *et al.*, 2002). Das im Kolon vorwiegend exprimierte Isoenzym ist die GSTP1; die GSTA und GSTM sind in geringerem Maße vorhanden (Awasthi *et al.*, 1994). In Kolonkarzinomen kommt es im Vergleich zu gesundem Gewebe oftmals zu einer Hochregulation der GSTP-Expression (Peters *et al.*, 1992). Eine Überexpression der GSTP1 im Kolonkarzinomgewebe bei gleichzeitig erhöhter GST-Gesamtaktivität wurde auch von weiteren Autoren beschrieben und wurde kürzlich für die beiden Kolontumorzelllinien HT29 und HT29 clone 19 a Zellen bestätigt (Moorghen *et al.*, 1991; Hengstler *et al.*, 1998; Ebert, 2003). Die erhöhten GSTP1-Gehalte in verschiedenen Tumorgeweben, aber vor allem in Geweben des Gastrointestinaltraktes, haben dazu geführt, dass GSTP1 als ein möglicher Tumormarker im Kolon diskutiert wird (Morse, 2001). Diskutiert werden in diesem Zusammenhang zwei Aspekte. Zum einen scheint die Überexpression von GSTP1 auf eine gleichzeitige Mutation im K-ras Gen zurückführbar zu sein, welche über die Aktivierung von AP-1 die verstärkte Expression des Enzyms zur Folge hat (Miyanishi *et al.*, 2001). Zum anderen führt man die erhöhte Chemoresistenz von Tumorzellen gegen z.B. Cisplatin und Adrinamycin auf die erhöhten Level an GSTP1, das als „multidrug resistant factor“ wirkt, zurück (Ban *et al.*, 1996; Tsuchida *et al.*, 1997). Chemoresistente Tumorzellen zeigen eine erhöhte GSTP1 Expression bzw. eine Überexprimierung von GSH-abhängigen Enzymen wie den GSTs und der Glutathion Peroxidase. Der in dieser Arbeit verwendete Grünteeextrakt konnte ebenso wie das Hauptkatechin aus Grüntee, EGCG, die mRNA Expression der  $\gamma$ -Glutamyl Cystein Synthetase ( $\gamma$ GCS), die in ihrer Promoterregion zwei AP-1-Bindungsstellen aufweist und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Synthese von GSH darstellt, induzieren (Jahn, 2004).

Die Beteiligung von AP-1 an der Regulation der GSTP kann angenommen werden aufgrund der bereits gezeigten Wirkung von GTE auf die Bindungsaktivität von AP-1.

Die meisten Ergebnisse zum Zusammenhang von Grüntee catechinen und GST-Aktivität liegen bisher aus Tierversuchsstudien vor. Dabei induzierte ein Grünteeextrakt die Genexpression des minimalen Glutathion S-transferase Ya Promoters der Ratte in transfizierten

HepG2-Zellen über die Aktivierung von MAP Kinasen und der Bindung von AP-1 (c-jun/c-fos) an das ARE (Yu *et al.*, 1997). Die hepatische GST-Aktivität von Wistar-Ratten konnte durch die Verabreichung von Grüntee im Trinkwasser über vier Wochen signifikant induziert werden (Bu-Abbas *et al.*, 1998; Maliakal *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie konnte ein Grünteeextrakt sowie einzelne Teekatechine die Induktion der Phase-II-Enzyme GST, QR sowie UGTs *in vitro* bewirken (Steele *et al.*, 2000; Weisburger und Chung, 2002). Die Fähigkeit von Grüntee und EGCG, Phase-II-Enzyme wie die GSTs zu induzieren, wird dementsprechend als krebsschutzmechanismus dieser Verbindungen in gesunden Zellen angesehen.

Geht man davon aus, dass die erhöhte Expression der *GSTP1* in Kolontumorgewebe mit einer ungünstigen Prognose für diese Patienten einhergeht, so stellt sich die Frage, ob eine Grüntee-vermittelte Induktion der GST-Gesamtaktivität, die im Kolon durch die hohe Menge der exprimierten *GSTP1* als ein Spiegel für die Aktivität der *GSTP1* angesehen werden kann, tatsächlich ein krebsschutzmechanisches Potential hat oder ob nicht vielmehr eine Verminderung der GST-Aktivität in Kolonkarzinomzellen von Vorteil ist, um so die Zelle mit Hilfe von Chemotherapeutika effektiv behandeln zu können. Seit gezeigt werden konnte, dass GSTs in Krebszelllinien die zelluläre Resistenz gegenüber kanzerogenen, wie z.B. alkylierenden Substanzen, erhöhen können, sind Substanzen, die als GST-Inhibitoren wirken können, von klinischer Relevanz (Ciaccio *et al.*, 1996). Eine Verminderung der GST-Aktivität in stark transformierten Kolonzellen, für die die HT29 Zellen ein Modell darstellen, durch Grüntee-katechine kann daher in Kombination mit Chemotherapeutika einen vielversprechenden Ansatz zur Krebstherapie darstellen.

Gerade das krebsschutzmechanische Potential von Grüntee bzw. EGCG im Kolon ist von besonderem Interesse, da nach hoher Aufnahme von Grüntee-katechinen zumindest im proximalen Kolon hohe Mengen an Teekatechinen im Vergleich zu den Mengen, die nach Grünteekonsum im Plasma gefunden werden, erwartet werden können. Es ist denkbar, dass ein Großteil der Grüntee-katechine von der Darmflora verstoffwechselt wird und im Kolon nur begrenzt zur Verfügung steht. Möglich wäre auch, dass Protein-Polyphenol-Komplexe entstehen, die wahrscheinlich nicht mehr von der Darmflora abgebaut werden können, aber an der Kolonmukosa sicher nur noch wenig wirksam sind. Hier liegen, ebenso wie zum Einfluss von Grüntee und seinen Inhaltsstoffen auf die GST-Expression im humanen Kolon bisher keine Daten aus der Literatur vor.

Ebert konnte kürzlich zeigen, dass eine 72-stündige Behandlung mit GTE bzw. EGCG unter serumhaltigen Bedingungen bis zu einer Konzentration von 40  $\mu$ M EGCG-Äquivalenten GTE bzw. 80  $\mu$ M EGCG keine Änderung der GST-Aktivität in HT29 Zellen zur Folge hat (Ebert, 2003). Ein möglicher Grund für die Diskrepanz der von Ebert erhaltenen Ergebnisse an HT29 Zellen zu den in dieser Arbeit vorgestellten Resultaten könnte neben dem Einfluss der Mediumwahl und der damit verbundenen Möglichkeit der Bindung von Serumproteinen aus dem Medium an Polyphenole daran liegen, dass nach einer 72-stündigen Inkubation der GTE bzw. das EGCG bereits vollständig von den Zellen metabolisiert wurde (Hong *et al.*, 2002). Zudem scheint die Grüntee catechin-vermittelte Änderung der Expression von GSTs ein relativ schnelles Ereignis in der Zelle zu sein, denn in einer an Ratten durchgeführten Studie konnte demonstriert werden, dass eine 28-fache GST-Aktivitätserhöhung in der Leber bereits 12 h nach der Infusion von EGCG in die Portalvene detektiert werden konnte. Die Autoren dieser Studie stellten ebenfalls fest, dass es bereits 3 h nach der Infusion zu einem Anstieg der GSTM2 mRNA kam, gefolgt von einem Anstieg im Proteingehalt der GSTM2 nach 9 h (Chou *et al.*, 2000). Möglicherweise war die Untersuchung der GST-Gesamtaktivität von Ebert nach 72 h ein zu spät gewählter Zeitpunkt.

Der GTE-vermittelte Anstieg der GST-Aktivität in der weniger transformierten Kolon-Adenomzelllinie LT97 ist hingegen eher positiv zu bewerten, da diese Zellen signifikant geringere Level an GSTP1 Protein exprimieren und beispielsweise empfindlicher auf das Lipidperoxidationsprodukt 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) reagieren als HT29 clone 19 a Zellen (Schaeferhenrich *et al.*, 2003). Ein zusätzlicher Schutz durch eine hohe GST-vermittelte Entgiftungskapazität ist hier ein wünschenswerter Effekt.

### **5.3.3 Grüntee catechine erhöhen die Expression der UGT1A1 in HT29 Zellen, nicht aber in LT97 Zellen**

Obwohl HT29 Zellen bereits eine mehr als 2-fach höhere basale UGT-Aktivität aufwiesen als LT97 Zellen, konnte GTE die mittels cDNA-Array gemessene Expression der *UGT1A1* in HT29 Zellen induzieren, nicht aber in LT97 Zellen. Zur Absicherung des Array-Screens wurde auch hier die Enzymaktivität untersucht. Als Substrat diente 4-Methylumbelliferon (4-MU). Während sowohl GTE als auch EGCG die Enzymaktivität in den höher transformierten HT29 Zellen induzieren konnten, zeigte sich bei den weniger transformierten LT97 Zellen keine Veränderung. Im Falle der vorliegenden Arbeit scheint also nicht nur die Struktur des Flavonoids, sondern auch die Wahl der Zelllinie bzw. des Gewebes von entscheidender Bedeutung (Walle und Walle, 2002).

Wie die GSTs bilden die UGTs im menschlichen Körper ein wichtiges Entgiftungssystem, wobei die Entgiftungskapazität der Zellen entscheidend durch das Spektrum der einzelnen UGT-Isoenzyme und die Höhe der Expression beeinflusst wird. UGTs metabolisieren Karzinogene, so dass die Entgiftung dieser Karzinogene als genereller Mechanismus bezeichnet werden kann. Die Expression der UGTs variiert in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe, wobei im Kolon signifikant niedrigere Glucuronidierungsraten gefunden als im Dünndarm oder der Leber (Peters *et al.*, 1991; Strassburg *et al.*, 1998b; Strassburg *et al.*, 1999a). Die Mehrzahl der malignen Tumoren im Verdauungstrakt ist im Kolon lokalisiert, wo die basale UGT-Aktivität im Vergleich zu anderen Geweben niedrig ist (Peters *et al.*, 1991; Mackenzie *et al.*, 1997; Strassburg *et al.*, 1999a). Insbesondere in Kolongewebe, welches sich dadurch auszeichnet, in direktem Kontakt zu Karzinogenen zu stehen, ist es von großer Bedeutung, eine Erhöhung der Entgiftungskapazität zu erzielen, um so die Empfindlichkeit gegenüber potentiellen Karzinogenen zu senken (van der Logt *et al.*, 2003). Kürzlich wurde dem Mechanismus der Glukuronidierung aber auch eine Bedeutung in der „drug resistance“ von Kolonkrebszellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika zugeschrieben. Die in HT29 Zellen gut exprimierte UGT1A9 konnte die beiden Topo-Isomerase-1-Hemmer SN-38 und NU/ICRF 505, die als bekannte Chemotherapeutika in der Behandlung von Kolonkrebs eingesetzt werden, effektiv glukuronidieren und damit wirkungslos machen (Cummings *et al.*, 2002; Cummings *et al.*, 2003). Die in CaCo2-Zellen beobachtete UGT1A1-Induktion durch das Flavonoid Chrysin war verbunden mit einem 10-fachen Anstieg an glukuronidiertem N-OH-PhIP (Galijatovic *et al.*, 2001). N-OH-PhIP, der Metabolit des beim Braten und Grillen von Fleisch entstehenden PhIP, wird effektiv durch UGTs, und hier speziell von der UGT1A1 glukuronidiert (Malfatti und Felton, 2001; Malfatti und Felton, 2004). Im Kolon könnte eine erhöhte Aktivität der UGTs und insbesondere der UGT1A1 verbunden sein mit einer gesteigerten Glukuronidierung des in gebratenem Fleisch gefundenen Karzinogens N-OH-PhIP. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass mit GTE vorbehandelte HT29 Zellen (2 und 8 µM EGCG-Äquivalente, 24 h) vor N-OH-PhIP-induzierten DNA-Schäden, die mittels Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet Assay“) gemessen wurden, nicht geschützt waren (unveröffentlichte Ergebnisse von M. Gleis, mündliche Korrespondenz). In dem von Gleis gewählten Versuchsansatz (HT29 Zellen, die 24 Stunden mit GTE vorbehandelt wurden, bevor eine 30 minütige Schädigung mit N-OH-PhIP folgte) zeigte sich, dass die erhöhte UGT-Aktivität keinen erhöhten Schutz gegenüber N-OH-PhIP bietet. Ein Grund für die fehlende Entgiftung von N-OH-PhIP könnte darin begründet liegen, dass die maximale Konzentration an UGT1A1-Protein nach 24-stündiger Behandlung mit GTE noch nicht erreicht wurde, denn Galijatovic *et al.* zeigten an CaCo-2 Zellen, dass die maximale

UGT1A1-Proteinkonzentration erst 72 h nach der Behandlung mit dem Flavonoid Chrysin erreicht war (Galijatovic *et al.*, 2001). Nichtsdestotrotz bleibt zu bemerken, dass eine Induktion der UGT-Enzymaktivität in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 nur bedingt wünschenswert ist, da es, wie im Falle der GSTP1 bereits erwähnt, denkbar ist, dass diese mit einer Erhöhung der Entgiftungskapazität bzw. einer Mehrfachresistenz einhergehen kann (Cummings *et al.*, 2003).

## **5.4 GTE und EGCG modulieren das Wachstum von humanen Kolonzellen**

### **5.4.1 Einfluss von GTE und EGCG auf das Wachstum von Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsstadiums**

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Messung des Zellwachstums in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit GTE und EGCG unter serumfreien Inkubationsbedingungen einen starken Einfluss auf die Zellzahl sowie die DNA-Synthese ausübt. So zeigte sich nach 24-stündiger Behandlung mit GTE ein signifikanter Anstieg der Zellzahl von HT29 Zellen, nicht aber in den anderen untersuchten Zelllinien. Längere Inkubationszeiten führten hingegen zu einer Reduktion des Zellwachstums in allen drei Zelllinien. Wurden die Zellen mit Medium (und Substanz) inkubiert, das 10 % FCS enthielt, war bis auf eine leichte Wachstumsreduktion durch eine 48-stündige Behandlung mit GTE in HT29 Zellen sowie eine signifikante Wachstumsreduktion um 29 % in HT29 clone 19 a Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit EGCG kein Einfluss von GTE/EGCG auf das Wachstum der Zellen zu verzeichnen. Dies zeigte sich auch an LT97-Zellen, die bis zu einer Konzentration von 120 µM EGCG-Äquivalenten GTE unter Serumeinfluss keinerlei Wachstumsreduktion nach 24 h und 72 h zeigten (persönliche Mitteilung von G. Beyer-Sehlmeyer, 2003).

Es gibt mehrere Gründe, die für die schwache Wirkung von GTE und EGCG unter serumhaltigen Kulturbedingungen verantwortlich gemacht werden können. Zum einen könnte die bewusst gering gewählten Dosen von EGCG/GTE ein Grund für die Unwirksamkeit sein. Ein weiterer Grund für die schwache Wirkung von GTE/EGCG unter Normalmedium ist die wahrscheinliche Bindung von Polyphenolen an Serumproteine, die für die herabgesetzte antioxidative Kapazität der Polyphenole unter solchen Bedingungen verantwortlich gemacht wird (Arts *et al.*, 2001; Arts *et al.*, 2002). Eine weitere Ursache dieser Beobachtung ist in der unterschiedlichen Stabilität der Grüntee catechine unter Zellkulturbedingungen zu suchen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Stabilität von EGCG abhängig vom verwendeten Kulturmedium ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch die Zugabe von FCS zum Zellkulturmedium nicht nur zu Protein-Flavonoid-Interaktionen führt, sondern auch generell einen Einfluss auf die Stabilität der Flavonoide haben kann.



Die Tatsache, dass die Wirkung von GTE und EGCG, die in SFM gelöst waren, auf alle drei untersuchten Zelllinien stärker war als unter serumhaltigen Kulturbedingungen, könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass die Grüntee catechine in SFM stabiler sind als in serumhaltigen Medien. Trotzdem zeigte kürzlich eine Studie von Chen *et al.*, dass unter einer Behandlung von HT29 Zellen mit serumreduziertem Medium (0,5 % FCS) und gleichzeitiger Behandlung mit EGCG für 36 h bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M kein wachstumsinhibierender Einfluss von EGCG zu verzeichnen war (Chen *et al.*, 2003).

Generell kann gesagt werden, dass Grüntee catechine das Wachstum von Krebszellen *in vitro* hemmen. Die Untersuchung der wachstumshemmenden Eigenschaften von Grüntee catechinen scheint im Falle von Kolonzellen sinnvoll, da pharmakokinetische Daten sowohl aus Tier- als auch aus Humanstudien auf eine Elimination über die Galle und das Intestinum (Kolon) schließen lassen. Ein wichtiger Anhaltspunkt in der Bewertung der Ergebnisse stellt die  $EC_{50}$  dar, die Konzentration einer Substanz, bei der ein halbmaximaler Effekt, in diesem Fall also eine 50 %-ige Wachstumshemmung eintritt (Übersicht in Tabelle 23 im Anhang II). Vergleicht man die Daten aus der Literatur zugrunde liegenden Versuchsbedingungen mit denen dieser Arbeit (verwendete Zellen, Nachweismethoden und Zellkulturmedien), lassen sich die großen Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von EGCG auf das Wachstum von Zellen erklären (Valcic *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Uesato *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen spiegeln sich z.B. im Konfluenzgrad der Zellen wider, bei dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. Ein möglicher Einflussfaktor des Wachstums ist der GSH-Gehalt der Zellen, der mit steigendem Konfluenzgrad der Zellen bzw. mit verminderter Proliferation, wie im Falle von konfluenten HT29 Zellen, sinkt. (Navarro *et al.*, 1999; Jahn, 2004). Ein weiterer, damit in Zusammenhang stehender Einflussfaktor ist die Vorinkubation der Zellen. Jahn konnte zeigen, dass GTE, nicht aber EGCG, den GSH-Gehalt in HT29 Zellen, die 24 h vor Substanzzugabe kultiviert wurden, signifikant erhöhen kann, wohingegen eine Vorinkubationszeit von 48 h nur zu einer tendenziellen Erhöhung des GSH-Spiegels führt (Jahn, 2004). Die langen Inkubationszeiten, die zum Teil in den beschriebenen Studien gewählt wurden, sind als kritisch anzusehen, wie die bereits erwähnten Daten von Hong *et al.* zur Stabilität von EGCG unter Zellkulturbedingungen belegen (Hong *et al.*, 2002).

In Rahmen dieser Arbeit konnte für die Adenomzelllinie LT97 keine  $EC_{50}$  bestimmt werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass über die bereits erwähnten Unterschiede in den Inkubationsbedingungen hinaus auch der Transformationsgrad der Zellen einen Einfluss auf

die Wachstumsinhibierung haben könnte. Es ist denkbar, dass zwischen der fehlenden Aktivierung der MAP Kinase ERK und der insgesamt schwachen Wachstumshemmung ein Zusammenhang besteht.

#### **5.4.2 Vergleich der Wirkung von GTE und EGCG auf das Wachstum von Kolonzelllinien**

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass GTE einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Kolonzellen ausübt als EGCG. Dies ist der erste Hinweis darauf, dass ein komplexes Grüntee-katechingemisch das Wachstum von Zelllinien beeinflussen kann. Aus der Literatur ist bisher lediglich bekannt, dass EGCG im Vergleich zu anderen Katechinen den stärksten Einfluss auf die Proliferation hat (Valcic *et al.*, 1996). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Kombination aus mehreren Katechinen zu einem synergistischen Effekt führt. Ein komplexer GTE, der aus einer Vielzahl verschiedener Katechine zusammengesetzt ist, wirkt stärker als ein isoliertes Katechin (Suganuma *et al.*, 1999; Morre *et al.*, 2003). Im Hinblick der Übertragung der Daten auf die in-vivo-Situation lässt sich daher schlussfolgern, dass der Konsum von komplexem Grüntee in der Krebsprävention einen vernünftigeren Ansatz darstellt als die Gabe von EGCG alleine.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Grüntee-katechine das Wachstum von Zellen in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, vom Kulturmedium sowie von der Wahl der Methode beeinflussen. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von GTE bzw. EGCG lassen darauf schließen, dass MAP Kinasen und AP-1 an der Wachstumsregulation der Zellen beteiligt sein können. Insbesondere korrelierte die beobachtete Zunahme des DNA-Gehaltes und der Zellzahl in HT29 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GTE gut mit der gesteigerten ERK-Aktivität nach GTE-Behandlung in diesen Zellen. Nachfolgende Untersuchungen zur Zell-Zyklus-Regulation sollten aber durchgeführt werden, um die beobachtete Wachstumsinduktion in HT29 Zellen durch GTE weiter absichern zu können.

## 6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten der Aufklärung der Mechanismen der Grüntee catechin-vermittelten Chemoprävention in humanen Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsgrades.

Aus dem ersten Teil der Arbeit, der sich mit der Wirkung eines komplexen GTE bzw. seiner Hauptcatechine auf Signaltransduktionswege beschäftigte, lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- \* Grüntee catechine erhöhten die metabolische Aktivität von Kolonzellen. Je transformierter die Zelle, umso weniger sensitiv reagiert sie auf Grüntee catechine.
- \* Hinsichtlich der Wirkung einzelner Catechine aus Grüntee war abgesehen vom komplexen GTE nur EGCG relevant.
- \* Die Erhöhung der metabolischen Aktivität durch GTE bzw. Grüntee catechine in den untersuchten Zelllinien erfolgte nicht über den vielfach in der Literatur zitierten EGF-Rezeptor. Die Reaktion der Zellen sprach aber für eine Rezeptor-Liganden-vermittelte Wirkung des GTE.
- \* Physiologische Konzentrationen von GTE/EGCG aktivierten die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 nur in den beiden Kolonkarzinomzelllinien, nicht aber in der Adenomzelllinie. Neben der Zellart selbst und der Stabilität der Grüntee catechine, die abhängig vom verwendeten Kulturmedium ist, ist nicht auszuschließen, dass in der Adenomzelllinie generell andere Mechanismen der Signalweiterleitung eine Rolle spielen als in den beiden untersuchten Karzinomzelllinien

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den aus den Signalkaskaden resultierenden Wirkungen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des Transkriptionsfaktors AP-1 und seiner Untereinheiten.

- \* Die Wirkung einer Kurzzeitinkubation mit Grüntee catechinen in Bezug auf Expression von *c-jun* und *c-fos* korrelierte gut mit der Aktivierung der MAP Kinasen. Dies spricht für eine Grüntee catechin-vermittelte Regulation von *c-jun* und *c-fos* über MAP Kinasen.
- \* Eine längerfristige Behandlung mit GTE führte zu einer erhöhten mRNA Expression von *c-jun* sowie zu einer erniedrigten Expression von *c-fos* und korrelierte damit gut mit den auf Protein-DNA-Bindung erhaltenen Ergebnissen. Die erhöhte Aktivität von AP-1 lässt den Schluss zu, dass eine differenzielle Genexpression von AP-1-relevanten Genen durch Grüntee catechine möglich ist.

- \* An der gestiegenen Bindungsaktivität von AP-1 waren die Transkriptionsfaktoren c-jun, fosB und c-fos beteiligt, wobei eine Zunahme von fosB auf Kosten von c-fos als wahrscheinlich angesehen werden kann.

Im dritten Teil der Arbeit wurde mittels eines cDNA-Arrays die Genexpression von 96 Enzymes des Fremdstoffmetabolismus in der weniger transformierten Adenomzelllinie LT97 sowie in der stark transformierten Karzinomzelllinie HT29 untersucht.

- \* Die Behandlung mit GTE führte zu einer differenziellen Expression folgender Gene: *ABCC2*, *UGT1A1*, *EPHX1*, *CHST7*, *SULT1A1*, *RPL13A*, *LOC5112*, *ACAT1*, *TPST1*, *CRAT1*
- \* GTE reprimierte die Expression der *GSTP1* sowie die Enzymaktivität der GSTs in der stark transformierten Zelllinie HT29. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 ist diese Grüntee catechin-vermittelte Wirkung als positiv einzuschätzen, da Kolonkarzinomzellen häufig bereits Resistenzen gegen Chemotherapeutika aufweisen. Ein verminderter Schutz von Karzinomzellen kann zum Absterben der Zellen führen.
- \* GTE konnte in der weniger transformierten Zelllinie LT97 die GST-Enzymaktivität induzieren, ohne die mRNA-Expression der *GSTP1* in diesen Zellen zu beeinflussen. Im Gegensatz zur stark transformierten Zelllinie HT29 ist die GTE-induzierte GST-Aktivität in der Adenomzelllinie ein wünschenswerter Mechanismus, durch den Grüntee catechine wirken können, um so die Entgiftungskapazität dieser Zellen zu erhöhen. An der Enzymerhöhung sind wahrscheinlich posttranslationale Ereignisse in der Zelle beteiligt.
- \* GTE/EGCG induzierte die Expression der *UGT1A1* und die Aktivität der UGTs in HT29 Zellen, nicht aber in der Adenomzelllinie LT97. Die Erhöhung der UGT-Aktivität in der stark transformierten Zelllinie ist nur bedingt wünschenswert, da die Verbesserung der Entgiftung in diesem Zellmodell mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verbunden sein kann.

Der vierte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Wirkung von Grüntee catechinen auf das Zellwachstum, welche eine weitere funktionelle Konsequenz für die Zellen als Reaktion auf Grüntee catechine, darstellt.

- \* Eine mittelfristige Behandlung mit GTE führte zu einer Wachstumssteigerung von HT29 Zellen, die ERK-vermittelt sein könnte, da sie positiv mit den Wirkkinetiken von GTE auf die MAP Kinase ERK korrelierte.

- \* Längere Behandlungen mit GTE/EGCG führten hingegen zu einer Wachstumshemmung in allen drei untersuchten Zelllinien. Die Adenomzelllinie LT97 reagierte auf die Behandlung mit GTE/EGCG weniger sensitiv als die beiden Kolonkarzinomzelllinien.
- \* Eine Behandlung der Zellen unter dem Einfluss von FCS hatte keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Grüntee catechine in Konzentrationen, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Konsum von Grüntee im Darmlumen erreicht werden, bereits „physiologische Konsequenzen“ *in vitro* zeigen. Die vorliegende Arbeit liefert grundlegende Erkenntnisse der Wirkung von Grüntee catechinen in Kolonzellen. Dabei stellte sich heraus, dass die Wirkung der Katechine nicht unabhängig vom Zellkulturmodell und damit dem Transformationsgrad der Zellen betrachtet werden kann. Der Vergleich der Wirkung von Grünteeextrakt mit einzelnen Grüntee catechinen (EGCG) hat gezeigt, dass eine stärkere Wirkung des komplexen Katechins-Gemischs im Vergleich zu Einzelkomponenten generell erwartet werden kann. Übertragen auf die *in vivo*-Situation kann insgesamt geschlossen werden, dass das Trinken von Grüntee einen sinnvolleren Ansatz in der Kolonkrebsprävention darstellt als der Verzehr von isolierten Einzelverbindungen aus Grüntee. Im Hinblick auf die Entstehung von Kolonkarzinomen ist der Einsatz von Grünteeprodukten nur dann kritisch zu bewerten, wenn bereits maligne Vorstufen im Kolon existieren.

In weiterführenden Studien, z.B. mit MAP Kinase Inhibitoren und Untersuchungen an Gen-Promotoren müsste allerdings geklärt werden, ob die GTE-vermittelte Wirkung auf den Fremdstoffmetabolismus und das Zellwachstum unabhängig vom Transformationsgrad über die Induktion von MAP Kinasen und den Transkriptionsfaktor AP-1 verläuft. Um die Wirkung von Grüntee catechinen in primären Kolonozyten zu prüfen, wäre die Durchführung einer Interventionsstudie mit Grüntee an gesunden Menschen bzw. an Menschen mit einem erhöhten Darmkrebs-Risiko (z.B. Colitis ulcerosa-Patienten) anzustreben. Die in solch einer Studie erhaltenen Gewebeproben könnten hinsichtlich ihrer Proliferationsrate sowie ihres GST-Status untersucht werden, um die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen.

## 7 Zusammenfassung

**Einleitung:** Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Es wird vermutet, dass die hohe Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Westeuropa in enger Beziehung zur Ernährung steht, denn in vielen epidemiologischen Studien wurde eine inverse Beziehung zwischen Krebsrisiko und einem hohen Verzehr von pflanzlicher Nahrung festgestellt. Neben einem hohen Verzehr von Obst und Gemüse sowie ausreichender körperlicher Aktivität wird auch dem Genuss von Grüntee eine mögliche Bedeutung in der Protektion von Krebserkrankungen zugesprochen. In vielen Tierstudien konnte ein protektiver Effekt von Grüntee gezeigt werden. Insbesondere in Bezug auf Tumoren des Gastrointestinaltrakts ist die Wirkung der wertgebenden Inhaltsstoffe des Grüntee, den Grüntee catechinen, aber umstritten. Die für die protektive Wirkung der Grüntee catechine in Frage kommenden molekularen Mechanismen sind sehr vielfältig. Einer der postulierten Mechanismen ist die Wirkung von Grüntee catechinen auf Signaltransduktionsketten und die damit verbundene differenzielle Genexpression, die als funktionelle Konsequenzen zu verändertem Wachstum und veränderten Enzymaktivitäten führen kann. Versuche an Tieren sind für Rückschlüsse auf Signaltransduktion und Genexpression aufgrund unterschiedlicher Promotorsequenzen und folglich anderer Expressions- und Induktionsmuster nur bedingt geeignet.

**Zielstellung:** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in humanen Kolonzelllinien (1.) die Modulation der Signaltransduktionswege der Familie der MAP Kinasen durch Grüntee catechine zu untersuchen, (2.) die Bedeutung des MAP Kinasen nachgeschalteten Transkriptionsfaktors AP-1 bzw. seine Untereinheiten sowie deren Beeinflussung durch Grüntee catechine aufzuklären, (3.) die Grüntee catechin-vermittelte differenzielle Expression von Fremdstoffmetabolismus-assoziierten Genen zu untersuchen und (4.) den Effekt von Grüntee catechinen auf funktionelle Konsequenzen (Enzymaktivität und Wachstum der Zellen) durch unterschiedliche Parameter näher zu bestimmen.

**Material und Methoden:** Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden an verschiedenen humanen Kolonzelllinien, die unterschiedliche Stadien der Kolonkarzinogenese repräsentieren, durchgeführt. Dabei kamen HT29 Zellen, ein bekanntes Modell einer Karzinomzelllinie und ihr differenzierter Klon 19 a zum Einsatz, sowie die kürzlich etablierte Adenomzelllinie LT97, die als Modell für ein frühes Stadium der Kolonkarzinogenese dient. Als Testsubstanzen wurden sowohl isolierte Grüntee catechine (EGCG, EGC, ECG, EC) als auch ein komplexer Grünteeextrakt erwendet. Die Inkubation mit diesen Testsubstanzen erfolgte über 24 –72 h, sowohl unter serumhaltigen als auch unter serumfreien Kulturbedin-

gungen. Untersuchungen zur Rezeptor-Liganden-Interaktion bzw. der metabolischen Aktivität erfolgten mit Hilfe der Zytosensor Mikrophysiometrie: Die Beurteilung des Phosphorylierungsstatus der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 wurde mittels Immunoblotting (phosphospezifische Antikörper) durchgeführt. Die Bestimmung der mRNA-Expression der AP-1-Untereinheiten *c-jun* und *c-fos* sowie des Entgiftungsenzyms *GSTP1* erfolgte mittels nicht-radioaktiver Northern Blotting Technik. Mit Hilfe des Reportergens sezernierende alkalische Phosphatase (SEAP) wurde die Bindungsaktivität der AP-1-Bindungsstelle TRE sowie der Bindungsstelle des NFkB untersucht. Die Aktivität von 7 verschiedenen AP-1-Untereinheiten auf Proteinebene wurde mit einer ELISA-Technik bestimmt. Ein Makro-Array wurde durchgeführt, um die Genexpression von 96 an Metabolismus und Entgiftung beteiligten Genen zu charakterisieren. Die sich bei dieser Methode als interessante Zielgene herausstellenden Gene *GSTP1* und *UGT1A1* wurden auf ihre Aktivität untersucht. Die Bestimmung der GST-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), die Bestimmung der UGT-Aktivität erfolgte fluoreszenzphotometrisch gegenüber 4-Methylumbelliferon (4-MU). Die Enzymaktivitäten wurden auf Basis des cytosolischen Proteingehalts und der Zellzahl berechnet, da der Proteingehalt der Zellen durch die Substanzbehandlung ebenfalls moduliert wurde, während die Zellzahl eine konstante Bezugsgröße darstellte. Schließlich wurde das Wachstum der Zellen nach Behandlung mit Grüntee catechinen mit Hilfe von DNA-Färbung (DAPI), Einbau von Brom-Desoxy-Uridin (BrdU) und Trypanblau untersucht.

**Ergebnisse:** 1. Metabolische Aktivität und Signaltransduktion Die beiden Karzinomzelllinien differierten hinsichtlich der Protonenausschleusung (als Maß für die metabolische Aktivität). Die stärker transformierte Zelllinie HT29 reagierte mit einer Änderung der AR nur während der Behandlung mit dem komplexen GTE ( $120 \pm 13,7 \%$  (8 min)) sowie EGCG ( $119 \pm 2,9 \%$  (16 min)), während die differenzierten HT29 clone 19a neben GTE ( $142 \pm 3,7 \%$  (12 min)) und EGCG ( $118 \pm 3,8 \%$  (24 min)) auch auf den Mix aus Grüntee catechinen sowie auf EGC und ECG mit einer Erhöhung der AR reagierten. Eine gleichzeitige Behandlung mit EGF und GTE führte in beiden Zelllinien zu einer höheren AR im Vergleich zu den AR der einzelnen Substanzen. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der drei MAP Kinasen ERK, JNK und p38 zeigte, dass der Einfluss von Grüntee catechinen auf die MAP Kinasen zellspezifisch war. In der am stärksten transformierten Zelllinie HT29 konnte eine Aktivierung der ERK durch GTE/EGCG beobachtet werden, die zum Zeitpunkt  $t_8$  am stärksten war. In der weniger transformierten Zelllinie HT29 clone 19a hingegen war eine Aktivierung der ERK gleichbleibend bis zum Zeitpunkt  $t_{48}$  messbar. In der Adenomzelllinie LT97 war keine Aktivierung der ERK durch GTE/EGCG detektierbar. Die MAP Kinase JNK wurde in HT29 nur

durch EGCG und die höchste eingesetzte GTE-Konzentration stark aktiviert, während HT29 clone 19a Zellen auf alle eingesetzten GTE-Konzentrationen mit einer JNK-Aktivierung reagierten. Die Aktivierung der MAP Kinase p38 war der Aktivierung der MAP Kinase JNK in beiden Zelllinien ähnlich.

2. Der Transkriptionsfaktor AP-1 Untersuchungen des Einflusses von GTE/EGCG auf die mRNA Expression der AP-1-Untereinheiten *c-jun* und *c-fos* in HT29 Zellen zeigten, dass diese unmittelbar nach Stimulus induziert werden konnten (Maximum in beiden Fällen bei 30-minütiger Behandlung). Eine längerfristige Behandlung mit GTE (24 h) führte zu einer signifikanten Induktion von *c-jun* mRNA (um das 1,56-fache) sowie zu einer tendenziellen Reduktion von *c-fos* mRNA. Dieses Ergebnis konnte in beiden Fällen auf Proteinebene bestätigt werden. Die Aktivität von AP-1, die c-fos-vermittelt war, wurde durch GTE dosisabhängig signifikant um das 1,74-fache (2 µM EGCG-Äquivalente GTE) bzw. um das 2,2-fache (8 µM EGCG-Äquivalente GTE) vermindert, wohingegen die c-jun -vermittelte AP-1-Aktivität signifikant um das 1,88-fache (2 µM EGCG-Äquivalente GTE) bzw. das 2,27-fache (8 µM EGCG-Äquivalente GTE) erhöht wurde. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass auch die bereits in der Kontrolle hohe AP-1-Bindungsaktivität des Proteins FosB durch die Behandlung mit GTE signifikant dosisabhängig um das 2,33-fache induziert werden konnte. Die Untersuchung von AP-1 mit Hilfe eines Reporter-Gen-Assays zeigte, dass GTE in der Konzentration von 8 µM EGCG-Äquivalenten sowie 8 µM EGCG selbst die Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE signifikant induzieren konnte.

3. Genexpressionsanalyse Das Screening der GTE-vermittelten differentiellen Genexpression von 96 Genen, die mit dem Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind, erfolgte in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 sowie der Adenomzelllinie LT97 mit Hilfe eines cDNA-Makroarray. Insgesamt konnten in HT29 Zellen 45 Gene erfasst werden, in LT97 waren 43 Gene identifizierbar. Insgesamt 10 Gene waren in jeweils nur einer der beiden Zelllinien exprimiert. In HT29 Zellen, die 24 h mit 2 µM EGCG-Äquivalenten GTE behandelt waren, waren 2 Gene differentiell exprimiert (*UGT1A1*, *RPL13A*). Wurden HT29 Zellen mit der 4-fach höheren Konzentration von GTE behandelt (24 h), waren insgesamt 5 Gene differentiell exprimiert. Als interessantes Zielgen erwies sich hier das Entgiftungsenzym UGT1A1. Die im Darm sehr stark exprimierte Glutathion S-Transferase P1 (*GSTP1*) konnte anhand des Array-Screenings nicht als reguliert identifiziert werden, eine genauere Analyse mit Hilfe des Northern Blots zeigte aber, dass die mRNA Expression von *GSTP1* in HT29 durch GTE signifikant reduziert werden konnte.

4. Funktionelle Konsequenzen – 4.1. Enzymaktivitäten Aufgrund der im Array-Screening detektierten differentiellen Genexpression der *UGT1A1* wurden HT29 und LT97 Zellen



hinsichtlich der UGT-Enzymaktivität untersucht. Die basale Aktivität war in der stark transformierten Zelllinie HT29 um 2,25-fach höher als in der weniger transformierten Zelllinie LT97 und konnte durch die Behandlung mit GTE/EGCG durch GTE signifikant induziert werden. Die Untersuchung der GST-Aktivität zeigte, dass die stärker transformierten HT29 Zellen mit einer um das 1,5-fach höheren basalen GST-Aktivität im Vergleich zu LT97 Zellen ausgestattet waren. Eine Behandlung mit GTE induzierte in LT97 Zellen die GST-Aktivität signifikant, wohingegen in HT29 Zellen die Aktivität der GST signifikant gehemmt werden konnte. Diese Hemmung kann aufgrund der hohen GSTP1-Gehalte in HT29 Zellen als eine Aktivitätshemmung der GSTP1 angesehen werden. 4.2. Zellwachstum Die aus der Literatur bekannte antiproliferative Wirkung von EGCG konnte in dieser Arbeit teilweise bestätigt werden. Sowohl GTE als auch EGCG hemmten das Zellwachstum zeit- und dosisabhängig, allerdings wurde in HT29 Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit GTE ein signifikanter Anstieg im DNA-Gehalt als Maß für die Zellproliferation beobachtet. Längere Behandlungen mit GTE/EGCG führten hingegen zu einer Wachstumshemmung in allen drei untersuchten Zelllinien. Die Adenomzelllinie LT97 reagierte auf die Behandlung mit GTE/EGCG weniger sensitiv als die beiden Kolonkarzinomzelllinien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Extrakt von Grüntee sowie das Hauptkatechin aus Grünem Tee EGCG sowohl die Signalketten der MAP Kinasen als auch die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 in humanen Kolonzellen modifizieren können. Desweiteren hat die Behandlung der Zellen mit GTE einen zellspezifischen Einfluss auf die Genexpression. Das AP-1-abhängige Gen GSTP1 wird in der stark transformierten Zelllinie HT29 sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Aktivitätsebene herunterreguliert. Da Kolonkarzinomzellen durch die hohe Aktivität von GSTP1 gegenüber chemotherapeutisch wirkenden Substanzen gut geschützt sind, stellt die Hemmung der GST-Aktivität möglicherweise einen geeigneten Angriffspunkt dar, diese Zellen effektiv aus dem Körper zu eliminieren (Apoptose-Induktion). In der Adenomzelllinie LT97 konnte die GST-Aktivität durch GTE induziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Zellen besser geschützt sind gegenüber einer weiteren chemikalien-induzierten Transformation. Die GTE/EGCG-vermittelte Aktivitätserhöhung der AP-1-unabhängigen UGTs in HT29 Zellen ist als kritisch zu bewerten. Es muss allerdings in weiterführenden Studien geprüft werden, ob diese Enzyminduktion tatsächlich einen Schutz vor ernährungsrelevanten toxischen Substanzen darstellt. Übertragen auf die Situation *in vivo* scheint das Trinken von Grüntee bzw. der Verzehr von Grünteepolyphenol-angereicherten funktionellen Lebensmitteln im Hinblick auf die Entstehung von Kolonkarzinomen nur dann kritisch zu sein, wenn bereits maligne Vorstufen im Körper existieren.

## Literaturverzeichnis

Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N. und Mukhtar, H. (2003). Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene* **22**, 1035-1044.

Ahn, W. S., Huh, S. W., Bae, S. M., Lee, I. P., Lee, J. M., Namkoong, S. E., Kim, C. K. und Sin, J. I. (2003). A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol* **22**, 217-224.

AICR (1997). *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, Washington.

Ameyar, M., Wisniewska, M. und Weitzman, J. B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**, 747-752.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739.

Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-157.

Arab, L. und Il'yasova, D. (2003). The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence. *J Nutr* **133**, 3310S-3318S.

Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **10**, 2-18.

Arts, M. J., Haenen, G. R., Voss, H. P. und Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chem Toxicol* **39**, 787-791.

Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P. und Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **50**, 1184-1187.

Augeron, C., Laboisie, C.L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate, *Cancer Res* **44**, 3961-3969

Awasthi, Y. C., Sharma, R. und Singhal, S. S. (1994). Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* **26**, 295-308.

Balasubramanian, S., Efimova, T. und Eckert, R. L. (2002). Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* **277**, 1828-1836.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A. und Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**, 693-704.

Ban, N., Takahashi, Y., Takayama, T., Kura, T., Katahira, T., Sakamaki, S. und Niitsu, Y. (1996). Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res* **56**, 3577-3582.

Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* **133**, 3248S-3254S.

Bergstrom, A., Pisani, P., Tenet, V., Wolk, A. und Adami, H. O. (2001). Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* **91**, 421-430.

Beyer-Sehlmeyer, G. (2003), persönliche Mitteilung

Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjonneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronso-ro, M., Gonzalez, C. A., Key, T. J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R. und Riboli, E. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **361**, 1496-1501.

Bock, K. W., Eckle, T., Ouzzine, M. und Fournel-Gigleux, S. (2000). Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **59**, 467-470.

Bode, A. M. und Dong, Z. (2003). Signal Transduction Pathways: Targets for Green and Black Tea Polyphenols. *J Biochem Mol Biol* **36**, 66-77.

Boldt, S., Weidle, U. H. und Kolch, W. (2002). The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis* **23**, 1831-1838.

Borde-Chiche, P., Diederich, M., Morceau, F., Wellman, M. und Dicato, M. (2001). Phorbol ester responsiveness of the glutathione S-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells. *Leuk Res* **25**, 241-247.

Borrelli, F., Capasso, R., Russo, A. und Ernst, E. (2004). Systematic review: green tea and gastrointestinal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther* **19**, 497-510.

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. und Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Briviba, K., Abrahamse, S. L., Pool-Zobel, B. L. und Rechkemmer, G. (2001). Neurotensin- and EGF-induced metabolic activation of colon carcinoma cells is diminished by dietary flavonoid cyanidin but not by its glycosides. *Nutr Cancer* **41**, 172-179.

Briviba, K., Pan, L. und Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J Nutr* **132**, 2814-2818.

Bu-Abbas, A., Clifford, M. N., Walker, R. und Ioannides, C. (1998). Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* **36**, 617-621.

Burchell, B., Brierley, C. H. und Rance, D. (1995). Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* **57**, 1819-1831.

Burchell, B., Nebert, D. W., Nelson, D. R., Bock, K. W., Iyanagi, T., Jansen, P. L., Lancet, D., Mulder, G. J., Chowdhury, J. R., Siest, G. und et al. (1991). The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol* **10**, 487-494.

Bushman, J. L. (1998). Green tea and cancer in humans: a review of the literature. *Nutr Cancer* **31**, 151-159.

Caderni, G., De Filippo, C., Luceri, C., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., Remy, S., Cheynier, V. und Dolara, P. (2000). Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* **21**, 1965-1969.

Chai, J. und Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* **53**, 147-157.  
Challa, A., Rao, D. R. und Reddy, B. S. (1997). Interactive suppression of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colon by phytic acid and green tea. *Carcinogenesis* **18**, 2023-2026.

Chan, U. P., Lee, J. F., Wang, S. H., Leung, K. L. und Chen, G. G. (2003). Induction of colon cancer cell death by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) is associated with increased p38 MAPK and decreased Bcl-xL. *Anticancer Drugs* **14**, 761-766.

Chang, L. und Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.

Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu, R., Owuor, E. D. und Kong, A. N. (2003). Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*.

Chen, C., Yu, R., Owuor, E. D. und Kong, A. N. (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* **23**, 605-612.

Chen, J. und Han, C. (2000). The Protective Effect of Tea on Cancer: Human Evidence. In *Phytochemicals as Bioactive Agents* (S. O. W. Bidlack, M. Meskin, D. Topham, Ed.). C.H.I.P.S., Weimar, Texas.

Chen, J. J., Ye, Z. Q. und Koo, M. W. (2004). Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line. *BJU Int* **93**, 1082-1086.

Chen, R. H., Juo, P. C., Curran, T. und Blenis, J. (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* **12**, 1493-1502.

Chen, W., Dong, Z., Valcic, S., Timmermann, B. N. und Bowden, G. T. (1999). Inhibition of ultraviolet B--induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line. *Mol Carcinog* **24**, 79-84.

Chen, Z. P., Schell, J. B., Ho, C. T. und Chen, K. Y. (1998). Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett* **129**, 173-179.

Cheng, Z., Radominska-Pandya, A. und Tephly, T. R. (1998). Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys* **356**, 301-305.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

Chou, F. P., Chu, Y. C., Hsu, J. D., Chiang, H. C. und Wang, C. J. (2000). Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem Pharmacol* **60**, 643-650.

Chung, J. H., Han, J. H., Hwang, E. J., Seo, J. Y., Cho, K. H., Kim, K. H., Youn, J. I. und Eun, H. C. (2003). Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *Faseb J* **17**, 1913-1915.

Ciaccio, P. J., Shen, H. und Tew, K. D. (1996). Effects of Glutathione S-Transferase Inhibitors on Detoxification Gene Expression. In *Glutathione S-Transferases - Structure, Function and Clinical Implications* (N. P. E. Vermeulen, G. J. Mulder, H. Nieuwenhuyse, W. H. M. Peters und P. J. van Bladeren, Eds.), pp. 213-225. Taylor & Francis Ltd., London.

Clapper, M. L. und Szarka, C. E. (1998). Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem Biol Interact* **111-112**, 377-388.

Clontech (2001). Mercury Pathway Profiling System User Manual

Collier, A. C., Tingle, M. D., Keelan, J. A., Paxton, J. W. und Mitchell, M. D. (2000). A highly sensitive fluorescent microplate method for the determination of UDP-glucuronosyl transferase activity in tissues and placental cell lines. *Drug Metab Dispos* **28**, 1184-1186.

Cummings, J., Boyd, G., Ethell, B. T., Macpherson, J. S., Burchell, B., Smyth, J. F. und Jodrell, D. I. (2002). Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation. *Biochem Pharmacol* **63**, 607-613.

Cummings, J., Ethell, B. T., Jardine, L., Boyd, G., Macpherson, J. S., Burchell, B., Smyth, J. F. und Jodrell, D. I. (2003). Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Res* **63**, 8443-8450.

Dashwood, R. H., Xu, M., Hernaez, J. F., Hasaniya, N., Youn, K. und Razzuk, A. (1999). Cancer chemopreventive mechanisms of tea against heterocyclic amine mutagens from cooked meat. *Proc Soc Exp Biol Med* **220**, 239-243.

Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**, 14553-14556.

Deloukas, P., Matthews, L. H., Ashurst, J., Burton, J., Gilbert, J. G., Jones, M., Stavrides, G., Almeida, J. P., Babbage, A. K., Baggeley, C. L., Bailey, J., Barlow, K. F., Bates, K. N., Beard, L. M., Beare, D. M., Beasley, O. P., Bird, C. P., Blakey, S. E., Bridgeman, A. M., Brown, A. J., Buck, D., Burrill, W., Butler, A. P., Carder, C., Carter, N. P., Chapman, J. C., Clamp, M., Clark, G., Clark, L. N., Clark, S. Y., Clee, C. M., Clegg, S., Cobley, V. E., Collier, R. E., Connor, R., Corby, N. R., Coulson, A., Coville, G. J., Deadman, R., Dhami, P., Dunn, M., Ellington, A. G., Frankland, J. A., Fraser, A., French, L., Garner, P., Grafham, D. V., Griffiths, C., Griffiths, M. N., Gwilliam, R., Hall, R. E., Hammond, S., Harley, J. L., Heath, P. D., Ho, S., Holden, J. L., Howden, P. J., Huckle, E., Hunt, A. R., Hunt, S. E., Jenkins, K., Johnson, C. M., Johnson, D., Kay, M. P., Kimberley, A. M., King, A., Knights, A., Laird, G. K., Lawlor, S., Lehtsaio, M. H., Leversha, M., Lloyd, C., Lloyd, D. M., Lovell, J. D., Marsh, V. L., Martin, S. L., McConnell, L. J., McLay, K., McMurray, A. A., Milne, S., Mistry, D., Moore, M. J., Mullikin, J. C., Nickerson, T., Oliver, K., Parker, A., Patel, R., Pearce, T. A., Peck, A. I., Phillimore, B. J., Prathalingam, S. R., Plumb, R. W., Ramsay, H., Rice, C. M., Ross, M. T., Scott, C. E., Sehra, H. K., Shownkeen, R., Sims, S., Skuce, C. D., et al. (2001). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* **414**, 865-871.

Desmots, F., Rauch, C., Henry, C., Guillouzo, A. und Morel, F. (1998). Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase A4 gene. *Biochem J* **336** ( Pt 2), 437-442.

Dietrich, C. G., de Waart, D. R., Ottenhoff, R., Bootsma, A. H., van Gennip, A. H. und Elferink, R. P. (2001). Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Carcinogenesis* **22**, 805-811.

Doll, R. und Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* **66**, 1191-1308.

Eaton, D. L. und Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* **49**, 156-164.

Ebert, M. N. (2003). Dissertation; Einfluss kurzkettiger Fettsäuren und sekundärer Pflanzenstoffe auf den Glutathion S-Transferasen-Status im Kolon. *Lehrstuhl f. Ernährungstoxikologie*. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Eferl, R. und Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-868.

Eichholzer, M. (2000). [Nutrition and cancer]. *Ther Umsch* **57**, 146-151.

Elmadfa und Leitzmann (1998). *Ernährung des Menschen*. Eugen Ulmer Verlag. 3. Auflage, Stuttgart

Fearon, E. R. und Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.

Frei, B. und Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* **133**, 3275S-3284S.

Frigo, D. E., Tang, Y., Beckman, B. S., Scandurro, A. B., Alam, J., Burow, M. E. und McLachlan, J. A. (2003). Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis*.

Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U. K. und Walle, T. (2001). Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells--potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm Res* **18**, 374-379.

Gao, Y. T., McLaughlin, J. K., Blot, W. J., Ji, B. T., Dai, Q. und Fraumeni, J. F., Jr. (1994). Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst* **86**, 855-858.

Glei, M., Matuschek, M., Steiner, C., Bohm, V., Persin, C. und Pool-Zobel, B. L. (2003). Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol In Vitro* **17**, 723-729.

Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. und Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-537.

Habig, W. H. und Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* **77**, 398-405.

Haenszel, W. und Kurihara, M. (1968). Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* **40**, 43-68.

Hafner, F. (2000). Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications. *Bio-sens Bioelectron* **15**, 149-158.

Hallier, E., Schroder, K. R., Asmuth, K., Dommermuth, A., Aust, B. und Goergens, H. W. (1994). Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase theta (GST T1-1). *Arch Toxicol* **68**, 423-427.

Hamilton-Miller, J. M. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* **50**, 299-302.

Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. und Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811.

Hayes, J. D. und Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**, 445-600.

Hayes, J. D. und Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**, 154-166.

- Hengstler, J. G., Bottger, T., Tanner, B., Dietrich, B., Henrich, M., Knapstein, P. G., Junginger, T. und Oesch, F. (1998). Resistance factors in colon cancer tissue and the adjacent normal colon tissue: glutathione S-transferases alpha and pi, glutathione and aldehyde dehydrogenase. *Cancer Lett* **128**, 105-112.
- Higdon, J. V. und Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**, 89-143.
- Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Nakamura, A., Akagi, K. und Shirai, T. (2001). Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-Dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett* **168**, 23-29.
- Hirose, M., Yamaguchi, T., Mizoguchi, Y., Akagi, K., Futakuchi, M. und Shirai, T. (2002). Lack of inhibitory effects of green tea catechins in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal carcinogenesis model: comparison of the different formulations, administration routes and doses. *Cancer Lett* **188**, 163-170.
- Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J. H., Hara, Y. und Yang, C. S. (2002). Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **62**, 7241-7246.
- Isozaki, T. und Tamura, H. (2001). Epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits the sulfation of 1-naphthol in a human colon carcinoma cell line, Caco-2. *Biol Pharm Bull* **24**, 1076-1078.
- Jahn, N. (2004). Diplomarbeit Modulation der  $\gamma$ GCS und des GSH-Status durch Katechine des Grünen Tees in humanen Kolontumorzellen, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie; Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Jaiswal, A. K. (1994). Antioxidant response element. *Biochem Pharmacol* **48**, 439-444.
- Jass, J. R. (2002). Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* **82**, 891-904.
- Jeong, W. S., Kim, I. W., Hu, R. und Kong, A. N. (2004). Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. *Pharm Res* **21**, 649-660.
- Jesnowski, R., Backhaus, C., Ringel, J. und Lohr, M. (2002). Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. *Pancreatology* **2**, 421-424.
- Ji, B., Ito, K., Suzuki, H., Sugiyama, Y. und Horie, T. (2002a). Multidrug resistance-associated protein2 (MRP2) plays an important role in the biliary excretion of glutathione conjugates of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **33**, 370-378.
- Ji, B. T., Dai, Q., Gao, Y. T., Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Fraumeni, J. F., Jr. und Chow, W. H. (2002b). Cigarette and alcohol consumption and the risk of colorectal cancer in Shanghai, China. *Eur J Cancer Prev* **11**, 237-244.
- Jia, X. und Han, C. (2001). Effects of green tea on colonic aberrant crypt foci and proliferative indexes in rats. *Nutr Cancer* **39**, 239-243.



- Jian, L., Xie, L. P., Lee, A. H. und Binns, C. W. (2004). Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int J Cancer* **108**, 130-135.
- Johnson, G. L. und Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Joossens, J. V., Hill, M. J., Elliott, P., Stamler, R., Lesaffre, E., Dyer, A., Nichols, R. und Kesteloot, H. (1996). Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol* **25**, 494-504.
- Kaiser, H. E. und Bartone, J. C. (1966). The carcinogenic activity of ordinary tea. *J Natl Med Assoc* **58**, 361.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H. K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. und Karin, M. (1994). JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* **8**, 2996-3007.
- Karin, M., Liu, Z. und Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-246.
- Katiyar, S. K. (2003). Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **3**, 234-242.
- Katiyar, S. K., Afaq, F., Azizuddin, K. und Mukhtar, H. (2001). Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol* **176**, 110-117.
- Katiyar, S. K., Mohan, R. R., Agarwal, R. und Mukhtar, H. (1997). Protection against induction of mouse skin papillomas with low and high risk of conversion to malignancy by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* **18**, 497-502.
- Katiyar, S. K. und Mukhtar, H. (1997). Inhibition of phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused inflammatory responses in SENCAR mouse skin by black tea polyphenols. *Carcinogenesis* **18**, 1911-1916.
- Kato, I., Tominaga, S., Matsuura, A., Yoshii, Y., Shirai, M. und Kobayashi, S. (1990). A comparative case-control study of colorectal cancer and adenoma. *Jpn J Cancer Res* **81**, 1101-1108.
- Kauffmann, H. M., Pfannschmidt, S., Zoller, H., Benz, A., Vorderstemann, B., Webster, J. I. und Schrenk, D. (2002). Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* **171**, 137-146.
- Kautenburger, T. (2000) Diplomarbeit, Stimulierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Pflanzenstoffe und ihre Metabolite. *Lehrstuhl f. Ernährungstoxikologie*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med* **27**, 985-991.

- Ketterer, B. (1998). Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic Res* **28**, 647-658.
- Khafif, A., Schantz, S. P., Chou, T. C., Edelstein, D. und Sacks, P. G. (1998). Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis* **19**, 419-424.
- Khan, S. G., Katiyar, S. K., Agarwal, R. und Mukhtar, H. (1992). Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* **52**, 4050-4052.
- Kim, M. H., Jung, M. A., Hwang, Y. S., Jeong, M., Kim, S. M., Ahn, S. J., Shin, B. A., Ahn, B. W. und Jung, Y. D. (2004). Regulation of urokinase plasminogen activator by epigallocatechin-3-gallate in human fibrosarcoma cells. *Eur J Pharmacol* **487**, 1-6.
- Kim, Y. I. und Mason, J. B. (1996). Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. *Nutr Rev* **54**, 259-279.
- Kitagawa, H., Fujita, M., Ito, N. und Sugahara, K. (2000). Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase. *J Biol Chem* **275**, 21075-21080.
- Koizumi, Y., Tsubono, Y., Nakaya, N., Nishino, Y., Shibuya, D., Matsuoka, H. und Tsuji, I. (2003). No association between green tea and the risk of gastric cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 472-473.
- Konig, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I. und Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 377-394.
- Kraus, G. (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. VHC Verlagsgesellschaft.
- Kumar, A. und Reddy, E. P. (2001). Genomic organization and characterization of the promoter region of murine GSTM2 gene. *Gene* **270**, 221-229.
- Kundu, J. K., Na, H. K., Chun, K. S., Kim, Y. K., Lee, S. J., Lee, S. S., Lee, O. S., Sim, Y. C. und Surh, Y. J. (2003). Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J Nutr* **133**, 3805S-3810S.
- Kuo, P. L. und Lin, C. C. (2003). Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci* **10**, 219-227.
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-869.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160.

Lämmlli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lambert, J. D. und Yang, C. S. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* **133**, 3262S-3267S.

Lee, M. J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S. und Yang, C. S. (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1025-1032.

Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741-752.

Liang, Y. C., Lin-shiau, S. Y., Chen, C. F. und Lin, J. K. (1997). Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J Cell Biochem* **67**, 55-65.

Lin, A. (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* **25**, 17-24.

Lin, J. K., Liang, Y. C. und Lin-Shiau, S. Y. (1999). Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* **58**, 911-915.

Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.

Lu, Y. P., Lou, Y. R., Xie, J. G., Yen, P., Huang, M. T. und Conney, A. H. (1997). Inhibitory effect of black tea on the growth of established skin tumors in mice: effects on tumor size, apoptosis, mitosis and bromodeoxyuridine incorporation into DNA. *Carcinogenesis* **18**, 2163-2169.

Lui, K. E., Panchal, A. S., Santhanagopal, A., Dixon, S. J. und Bernier, S. M. (2002). Epidermal growth factor stimulates proton efflux from chondrocytic cells. *J Cell Physiol* **192**, 102-112.

Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F. und Nebert, D. W. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**, 255-269.

Maeda-Yamamoto, M., Suzuki, N., Sawai, Y., Miyase, T., Sano, M., Hashimoto-Ohta, A. und Isemura, M. (2003). Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem* **51**, 1858-1863.

Magaud, J. P., Sargent, I. und Mason, D. Y. (1988). Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* **106**, 95-100.

Malfatti, M. A. und Felton, J. S. (2001). N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* **22**, 1087-1093.

Malfatti, M. A. und Felton, J. S. (2004). Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Is the Primary Enzyme Responsible for the N-Glucuronidation of N-Hydroxy-PhIP in Vitro. *Chem Res Toxicol* **17**, 1137-1144.

Maliakal, P. P., Coville, P. F. und Wanwimolruk, S. (2001). Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol* **53**, 569-577.

Mannervik, B. und Danielson, U. H. (1988). Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* **23**, 283-337.

Marian, B. (2002), persönliche Mitteilung.

Marquard, H. und Schäfer, S. (2003). *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Masuda, M., Suzui, M., Lim, J. T., Deguchi, A., Soh, J. W. und Weinstein, I. B. (2002). Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol* **2**, 350-359.

Masuda, M., Suzui, M. und Weinstein, I. B. (2001). Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **7**, 4220-4229.

McConnell, H. M., Owicki, J. C., Parce, J. W., Miller, D. L., Baxter, G. T., Wada, H. G. und Pitchford, S. (1992). The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* **257**, 1906-1912.

Metz, N., Lobstein, A., Schneider, Y., Gosse, F., Schleiffer, R., Anton, R. und Raul, F. (2000). Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. *Nutr Cancer* **38**, 60-64.

Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M. und Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* **274** ( Pt 2), 409-414.

Milde-Langosch, K., Kappes, H., Riethdorf, S., Loning, T. und Bamberger, A. M. (2003). FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **77**, 265-275.

Mittal, A., Pate, M. S., Wylie, R. C., Tollefsbol, T. O. und Katiyar, S. K. (2004). EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol* **24**, 703-710.

Miyanishi, K., Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Nobuoka, A., Nakajima, T., Takimoto, R., Kogawa, K., Kato, J., Sakamaki, S. und Niitsu, Y. (2001). Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology* **121**, 865-874.

Moffat, G. J., McLaren, A. W. und Wolf, C. R. (1994). Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem* **269**, 16397-16402.

Monaghan, G., Povey, S., Burchell, B. und Boxer, M. (1992). Localization of a bile acid UDP-glucuronosyltransferase gene (UGT2B) to chromosome 4 using the polymerase chain reaction. *Genomics* **13**, 908-909.

Moorghen, M., Cairns, J., Forrester, L. M., Hayes, J. D., Hall, A., Cattan, A. R., Wolf, C. R. und Harris, A. L. (1991). Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. *Carcinogenesis* **12**, 13-17.

Morre, D. J., Morre, D. M., Sun, H., Cooper, R., Chang, J. und Janle, E. M. (2003). Tea catechin synergies in inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). *Pharmacol Toxicol* **92**, 234-241.

Morse, M. A. (2001). The role of glutathione S-transferase P1-1 in colorectal cancer: friend or foe? *Gastroenterology* **121**, 1010-1013.

Morse, M. A. und Stoner, G. D. (1993). Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* **14**, 1737-1746.

Muir, D., Varon, S. und Manthorpe, M. (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem* **185**, 377-382.

Mukhtar, H. und Ahmad, N. (1999). Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol Sci* **52**, 111-117.

Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. und Curran, T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* **312**, 716-720.

Munzel, P. A., Schmohl, S., Buckler, F., Jaehrling, J., Raschko, F. T., Kohle, C. und Bock, K. W. (2003). Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells. *Biochem Pharmacol* **66**, 841-847.

Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C. und Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**, 556-564.

Nagano, J., Kono, S., Preston, D. L. und Mabuchi, K. (2001). A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). *Cancer Causes Control* **12**, 501-508.

Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. und Imai, K. (2000). Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* **13**, 49-54.

- Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Avino, J., Perez, P. und Estrela, J. M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic Biol Med* **26**, 410-418.
- Ng, D. C., Shafae, S., Lee, D. und Bikle, D. D. (2000). Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem* **275**, 24080-24088.
- Nkondjock, A., Shatenstein, B., Maisonneuve, P. und Ghadirian, P. (2003). Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* **27**, 55-66.
- Nowell, S. A., Massengill, J. S., Williams, S., Radominska-Pandya, A., Tephly, T. R., Cheng, Z., Strassburg, C. P., Tukey, R. H., MacLeod, S. L., Lang, N. P. und Kadlubar, F. F. (1999). Glucuronidation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine by human microsomal UDP-glucuronosyltransferases: identification of specific UGT1A family isoforms involved. *Carcinogenesis* **20**, 1107-1114.
- Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S. J., Nomura, T., Suganuma, M. und Fujiki, H. (1999). Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* **90**, 733-739.
- Okazaki, K. und Sagata, N. (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *Embo J* **14**, 5048-5059.
- Oliver, B. L., Sha'afi, R. I. und Hajjar, J. J. (1995). Transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor activate mitogen-activated protein kinase and its substrates in intestinal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **210**, 162-170.
- Owicki, J. C. und Parce, J. W. (1992). Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens Bioelectron* **7**, 255-272.
- Park, H. J., Kim, B. C., Kim, S. J. und Choi, K. S. (2002). Role of MAP kinases and their cross-talk in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* **35**, 1360-1371.
- Park, J. W., Choi, Y. J., Suh, S. I. und Kwon, T. K. (2001). Involvement of ERK and protein tyrosine phosphatase signaling pathways in EGCG-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 721-725.
- Peters, W. H., Boon, C. E., Roelofs, H. M., Wobbes, T., Nagengast, F. M. und Kremers, P. G. (1992). Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa. *Gastroenterology* **103**, 448-455.
- Peters, W. H., Kock, L., Nagengast, F. M. und Kremers, P. G. (1991). Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut* **32**, 408-412.
- Porstmann, T., Ternynck, T. und Avrameas, S. (1985). Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* **82**, 169-179.

- Read, S. M. und Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* **116**, 53-64.
- Reddy, S. P. und Mossman, B. T. (2002). Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L1161-1178.
- Reichelt, W. H., Yndestad, A., Wright, M. S., Elgjo, K., Haug, T. und Reichelt, K. L. (2003). The colon mitosis-inhibitor pyroglutamyl-histidyl-glycine alters expression of immediate-early cancer-related genes in HT-29 cells. *Anticancer Res* **23**, 1229-1234.
- Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E. M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M. und Beug, H. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* **71**, 1103-1116.
- Renard, P., Ernest, I., Houbion, A., Art, M., Le Calvez, H., Raes, M. und Remacle, J. (2001). Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res* **29**, E21.
- Richter, M., Jurek, D., Wrba, F., Kaserer, K., Wurzer, G., Karner-Hanusch, J. und Marian, B. (2002). Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer* **38**, 1937-1945.
- Risse-Hackl, G., Adamkiewicz, J., Wimmel, A. und Schuermann, M. (1998). Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP-1 proteins. *Oncogene* **16**, 3057-3068.
- Ritter, J. K., Kessler, F. K., Thompson, M. T., Grove, A. D., Auyeung, D. J. und Fisher, R. A. (1999). Expression and inducibility of the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 in liver and cultured primary hepatocytes: evidence for both genetic and environmental influences. *Hepatology* **30**, 476-484.
- Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E. und Pickett, C. B. (1990). Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3826-3830.
- Sah, J. F., Balasubramanian, S., Eckert, R. L. und Rorke, E. A. (2003). Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway: evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem*.
- Sakai, M., Okuda, A. und Muramatsu, M. (1988). Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9456-9460.
- Sanjoaquin, M. A., Appleby, P. N., Thorogood, M., Mann, J. I. und Key, T. J. (2004). Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10 998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *Br J Cancer* **90**, 118-121.
- Sartippour, M. R., Shao, Z. M., Heber, D., Beatty, P., Zhang, L., Liu, C., Ellis, L., Liu, W., Go, V. L. und Brooks, M. N. (2002). Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* **132**, 2307-2311.

Satomi, Y., Miyamoto, S. und Gould, M. N. (1999). Induction of AP-1 activity by perillyl alcohol in breast cancer cells. *Carcinogenesis* **20**, 1957-1961.

Scalbert, A. und Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S-2085S.

Schaeferhenrich, A., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Kuechler, A., Haag, N., Weise, A., Liehr, T., Claussen, U., Marian, B., Sendt, W., Scheele, J. und Pool-Zobel, B. L. (2003). Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res* **526**, 19-32.

Shaulian, E. und Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-136.

Sherratt, P. J., Williams, S., Foster, J., Kernohan, N., Green, T. und Hayes, J. D. (2002). Direct comparison of the nature of mouse and human GST T1-1 and the implications on dichloromethane carcinogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **179**, 89-97.

Siddiqui, I. A., Adhami, V. M., Afaq, F., Ahmad, N. und Mukhtar, H. (2004). Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **91**, 232-242.

Slattery, M. L. (2000). Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* **11**, 142-146.

Sporn, M. B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res* **36**, 2699-2702.

Stallmach, A., Orzechowski, H. D., Feldmann, P., Riecken, E. O., Zeitz, M. und Herbst, H. (1999). 32/67-kD laminin receptor expression in human colonic neoplasia: elevated transcript levels correlate with the degree of epithelial dysplasia. *Am J Gastroenterol* **94**, 3341-3347.

Steele, V. E., Kelloff, G. J., Balentine, D., Boone, C. W., Mehta, R., Bagheri, D., Sigman, C. C., Zhu, S. und Sharma, S. (2000). Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis* **21**, 63-67.

Stoner, G. D., Morse, M. A. und Kelloff, G. J. (1997). Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 4**, 945-954.

Strassburg, C. P., Kneip, S., Topp, J., Obermayer-Straub, P., Barut, A., Tukey, R. H. und Manns, M. P. (2000). Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* **275**, 36164-36171.

Strassburg, C. P., Manns, M. P. und Tukey, R. H. (1998a). Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* **273**, 8719-8726.

Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. und Tukey, R. H. (1998b). Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol* **54**, 647-654.



Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. und Tukey, R. H. (1999a). UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* **116**, 149-160.

Strassburg, C. P., Strassburg, A., Nguyen, N., Li, Q., Manns, M. P. und Tukey, R. H. (1999b). Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* **338** ( Pt 2), 489-498.

Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. und Fujiki, H. (1999). Synergistic effects of (–)-epigallocatechin gallate with (–)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Res* **59**, 44-47.

Sun, X. Y., Plouzek, C. A., Henry, J. P., Wang, T. T. und Phang, J. M. (1998). Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* **58**, 2379-2384.

Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768-780.

Suto, R., Tominaga, K., Mizuguchi, H., Sasaki, E., Higuchi, K., Kim, S., Iwao, H. und Arawaka, T. (2004). Dominant-negative mutant of c-Jun gene transfer: a novel therapeutic strategy for colorectal cancer. *Gene Ther* **11**, 187-193.

Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. und Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 380-381.

Tomeo, C. A., Colditz, G. A., Willett, W. C., Giovannucci, E., Platz, E., Rockhill, B., Dart, H. und Hunter, D. J. (1999). Harvard Report on Cancer Prevention. Volume 3: prevention of colon cancer in the United States. *Cancer Causes Control* **10**, 167-180.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

Tsuchida, S., Kimura, J., Hayakari, M. und Ishikawa, T. (1997). [Usefulness of glutathione S-transferase as a tumor marker]. *Rinsho Byori* **45**, 1125-1132.

Tutton, M. G., George, M. L., Eccles, S. A., Burton, S., Swift, R. I. und Abulafi, A. M. (2003). Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* **107**, 541-550.

Uesato, S., Kitagawa, Y., Kamishimoto, M., Kumagai, A., Hori, H. und Nagasawa, H. (2001). Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett* **170**, 41-44.

Vaidyanathan, J. B. und Walle, T. (2001). Transport and metabolism of the tea flavonoid (–)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm Res* **18**, 1420-1425.

Vaidyanathan, J. B. und Walle, T. (2002). Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (–)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metab Dispos* **30**, 897-903.

- Valcic, S., Timmermann, B. N., Alberts, D. S., Wachter, G. A., Krutzsch, M., Wymer, J. und Guillen, J. M. (1996). Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* **7**, 461-468.
- van der Logt, E. M., Roelofs, H. M., Nagengast, F. M. und Peters, W. H. (2003). Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anti-carcinogens. *Carcinogenesis* **24**, 1651-1656.
- von Kleist, S., Chany, E., Burtin, P., King, M. und Fogh, J. (1975). Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst* **55**, 555-560.
- Walle, U. K. und Walle, T. (2002). Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metab Dispos* **30**, 564-569.
- Wang, Y. C. und Bachrach, U. (2002). The specific anti-cancer activity of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Amino Acids* **22**, 131-143.
- Warden, B. A., Smith, L. S., Beecher, G. R., Balentine, D. A. und Clevidence, B. A. (2001). Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* **131**, 1731-1737.
- Wattenberg, L. W. (1993). Prevention--therapy--basic science and the resolution of the cancer problem. *Cancer Res* **53**, 5890-5896.
- Watzl, B. und Rechkemmer, G. (2001). Flavonoide. *Ernährungsumschau* **48**, 498-502.
- Weinreb, O., Mandel, S. und Youdim, M. B. (2003). Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, R-apomorphine, green tea polyphenol (-)-epigallocatechine-3-gallate, and melatonin. *Ann N Y Acad Sci* **993**, 351-361; discussion 387-393.
- Weisburger, J. H. und Chung, F. L. (2002). Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food Chem Toxicol* **40**, 1145-1154.
- Whitmarsh, A. J., Shore, P., Sharrocks, A. D. und Davis, R. J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**, 403-407.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. und Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**, 143-180.
- Willett, W. C. (2001). Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 3-8.
- Williamson, G., Faulkner, K. und Plumb, G. W. (1998). Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. *Eur J Cancer Prev* **7**, 17-21.
- Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* **253**, 180-185.
- Wolter, F., Turchanowa, L. und Stein, J. (2003). Resveratrol-induced modification of polyamine metabolism is accompanied by induction of c-Fos. *Carcinogenesis* **24**, 469-474.

- Xia, C., Hu, J., Ketterer, B. und Taylor, J. B. (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J* **313** (Pt 1), 155-161.
- Xie, W., Yeuh, M. F., Radominska-Pandya, A., Saini, S. P., Negishi, Y., Bottroff, B. S., Cabrera, G. Y., Tukey, R. H. und Evans, R. M. (2003). Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4150-4155.
- Yamane, T., Hagiwara, N., Tateishi, M., Akachi, S., Kim, M., Okuzumi, J., Kitao, Y., Inagake, M., Kuwata, K. und Takahashi, T. (1991). Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Jpn J Cancer Res* **82**, 1336-1339.
- Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C. und Schantz, S. P. (1998a). Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 351-354.
- Yang, C. S., Chung, J. Y., Yang, G., Chhabra, S. K. und Lee, M. J. (2000). Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* **130**, 472S-478S.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. und Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**, 381-406.
- Yang, C. S., Maliakal, P. und Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 25-54.
- Yang, C. S. und Wang, Z. Y. (1993). Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1038-1049.
- Yang, G. Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J. und Yang, C. S. (1998b). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* **19**, 611-616.
- Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J. und Lin, A. (2004). JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* **13**, 329-340.
- Yu, R., Jiao, J. J., Duh, J. L., Gudehithlu, K., Tan, T. H. und Kong, A. N. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* **18**, 451-456.
- Yueh, M. F., Huang, Y. H., Hiller, A., Chen, S., Nguyen, N. und Tukey, R. H. (2003). Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* **278**, 15001-15006.
- Zhu, M., Chen, Y. und Li, R. C. (2000). Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med* **66**, 444-447.

## Anhang I: Geräte, Lösungen und Puffer

### GERÄTE

Analysenwaage (Sartorius Basic plus)	Sartorius, Göttingen
BioRad-Multimanagers	Bio-Rad, München
Brutschrank (Steri Cult 200)	Forma Scientific, Inc.
CCD-Kamera (LAS 1000)	Fuji über Raytest, Straubenhardt
Elektronikrührer (Monotherm variomag)	H+P Labortechnik, München
Elektrophoreseeinheit (Consort E831)	cti, Idstein/Taunus
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, horizontal	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, vertikal	cti, Idstein/Taunus
Folienschweißgerät	Petra Haushaltsgeräte
Gelgießstand	cti, Idstein/Taunus
Magnetrührer (Combimag)	Fisher Scientific, Schwerte
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Minischüttler (MS1 Minishaker)	IKA-Werke, Staufen
MTP-Fluoreszenz-Photometer (SpectralFluor Plus) .....	Tecan, Crailsheim
Photometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg
SemiDry Blotter.	cti, Idstein/Taunus
Sterile Werkbank (Herasafe H12) .	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Compact) .....	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (CR 4.22)	Jouan GmbH, Hanau
Titan-Ultraschall-Homogenisator Sonoplus ...	Bandelin electronic, Berlin
Ultraschallbad (Ultracleaner Eltrosonic)	neoLab, Heidelberg
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, München
UV-Vis-Spektrophotometer Cary 3 E	Varian Deutschland, Darmstadt
Wärmeplatte (HP 9060)	Labotect, Göttingen
Wasserbad.....	Memmert, Schwabach
Wippe (Duomax 1030) .	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge (biofuge fresco).....	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge (biofuge pico).	Heraeus Instruments, Hanau
Zytosensor Mikrophysiometer	Molecular Devices, Inc.

### ARBEITSMITTEL

Einweg-Pipetten (2 ml – 50 ml).....	Fisher Scientific, Schwerte
Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB 004).....	Schleicher und Schuell, Dassel
Handstückzähler .....	Carl Roth, Karlsruhe
Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpipette)....	Brand, Wertheim
Mikrotiterplatten (96 well), 6-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (0,2 µl – 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen filter tip Gel 100	Greiner, Frickenhausen
Pipettierhilfe (accu-jet) ....	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (0,2 - 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml) .....	Greiner, Frickenhausen
SLG Filterspitzen	Süd-Laborbedarf, Gauting
Sterilfilter FisherBrand	Fisher Scientific, Schwerte
Transwell-Einsätze für 6-well-Platten	Fisher Scientific, Schwerte
Ultrazentrifugenröhrchen (ultraclear)	Beckmann Coulter, München

Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber, steril.....	Greiner, Frickenhausen
Zellzählkammer nach NEUBAUER (geeicht).....	Fisher Scientific, Schwerte

## LÖSUNGEN

Die im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und, soweit nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

## ZELLKULTUR

### HT29 Wachstumsmedium

DMEM	450 ml
FCS	50 ml (10 %)
Pen Strep	5 ml (1 %)

### LT97 Wachstumsmedium

MCDB 302 Medium	400 ml (4 Teile)
L-15 Leibovitz Medium	100 ml (1 Teil)
FCS	2 %
Insulin	10 µg/ml
Triiodotyronin	$2 \times 10^{-10}$ M
Transferrin	2 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Natriumselenit	$5 \times 10^{-9}$ M
EGF	30 ng/ml

### Trypsin-Versene-Lösung (Fertiglösung)

Trypsin [10x] 25 g/ml physiologischer Kochsalzlösung	10 ml
Versene [10x] 0,2 g/L isotonisch gepufferter Kochsalzlösung	100 ml

### Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
pH 7,3 (mit 1N NaOH eingestellt); autoklaviert	

### PBS + Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>

MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,13 g/l PBS
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,10 g/l PBS
pH 7,3; steril filtriert	

### PBS + Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> + BSA [0,5 %]

BSA	5 g/l PBS + Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>
pH 7,3; steril filtriert	

**CYTOSOLEXTRAKTION / GST-AKTIVITÄT / PROTEINBESTIMMUNG****BSA-Standard**

BSA 1 % (10 mg/ml)  
in PBS

**Bradfordreagenz** (nach Read und Northcote, 1981)

Coomassie Brilliant Blue 250G 0,01 %  
Phosphorsäure 1,6 M  
Ethanol 0,8 M

**Homogenisationspuffer**

Tris 20 mM  
Saccharose 250 mM  
DTT 1 mM  
Pefabloc (Zugabe nach Einstellen des pH-Wertes) 1 mM  
pH 7,4 (mit 2 N HCl eingestellt)

**WESTERN BLOTS****SDS-PAGE-Ladepuffer**

Tris HCl 120 mM  
SDS 4 %  
Glycerin 20 %  
DTT 100 mM  
Bromphenolblau 0,1 % (w/v)  
pH 6,8, Lagerung in Aliquots bei -20 °C

**Elektrophoresepuffer**

Tris/HCl 25 mM  
Glycin 192 mM  
SDS 0,1 % (w/v)

**Blottingpuffer**

Tris/HCl 25 mM  
Glycin 192 mM  
SDS 0,05 % (w/v)  
Methanol 5 % (v/v)

**Gelfärbelösung**

Coomassie Blau G 250 0,2 g  
Methanol 90 ml  
Essigsäure 20 ml  
unter Rühren lösen  
H<sub>2</sub>O ad 200 ml  
filtriert, Lagerung: lichtgeschützt, 4°C

**Tris Buffered Saline (TBS) [10x]**

Tris-HCl 160 mM  
Tris 40 mM  
NaCl 1,37 M  
pH 7,4 (mit konz. HCl eingestellt); autoklaviert; Lagerung: RT

**TBS Tween (TBST)**

TBS [10x]	200 ml
H <sub>2</sub> O	1800 ml
Tween 20	1 ml
Lagerung: RT (1 Woche)	

**Blockingpuffer mit 5 % (w/v) Milchpulver**

Milchpulver	50 g
TBST	1 l
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

**„Stripping“-Puffer für Western Blot**

β-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2 %
Tris	62,5 mM
pH 6,8	

**NORTHERN BLOTS****RNA-Auftragspuffer-Stammlösung**

Bromphenolblau	0,07 % (w/v)
SDS	7 % (w/v)
Glycerin	33 % (w/v)

**RNA-Auftragspuffer-Gebrauchslösung**

10 x MOPS	3,6 µl
Formaldehyd (37 %)	6,4 µl
Formamid	18 µl
Auftragspuffer-Stammlösung	4 µl
EtBr	0,2 µl
Lagerung bei -20 °C	

**DMPC-Wasser**

DMPC	0,1 %
in ddH <sub>2</sub> O, über Nacht rühren unter Abzug, am nächsten Tag autoklavieren	
Lagerung: RT	

**MOPS-Puffer (10x)**

MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
mit Eisessig auf 7,0 einstellen; steril filtrieren	
DMPC-H <sub>2</sub> O.	ad 1 l
Lagerung: RT	

**MOPS-Puffer (1x)**

MOPS-Puffer (10x)	10 % (v/v)
in DMPC-H <sub>2</sub> O	
Lagerung: RT	

**LiCl-Lösung**

LiCl 4 M  
in DMPC-H<sub>2</sub>O  
Lagerung: RT

**Maleinsäurepuffer**

Maleinsäure 0,1 M  
NaCl 0,15 M  
ad 1 l mit DMPC-H<sub>2</sub>O  
pH 7,5  
autoklavieren, Lagerung bei RT

**Detektionspuffer**

Tris-HCl oder Tris 100 mM  
NaCl 100 mM  
ad 1 l mit DMPC-H<sub>2</sub>O  
pH 9,5  
autoklavieren, Lagerung bei RT

**20 x SSC**

NaCl 175,4 g  
Tri-Na-Citrat-Dihydrat 88,2 g  
auf 1 l auffüllen mit dd H<sub>2</sub>O  
pH 7,0 einstellen, autoklavieren

**2xSSC Waschpuffer**

20 x SSC 100 ml  
10 % SDS 1 ml  
ad 1 l mit autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O  
Lagerung bei RT

**0,3xSSC Waschpuffer**

20 x SSC 15 ml  
10 % SDS 1 ml  
ad 1 l mit autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O  
Lagerung bei RT

**Wash and Block – Waschpuffer**

Maleinsäurepuffer 1 l  
Tween 20 3 ml  
Lagerung bei RT

**Blocking-Puffer - Stammlösung: 10 X**

Blocking Reagenz ( Roche) 25 g  
ad 250 ml mit Maleinsäurepuffer  
Autoklavieren  
Lagerung bei 4°C

**Blocking-Puffer-Gebrauchslösung: 1X**

10 X Blocking-Puffer-Stammlösung 50 ml  
Ad 500 ml Maleinsäurepuffer  
Lagerung bei 4°C



**Phosphatpuffer, 1M**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8 g
Ad 100 ml mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O	
pH 7,0	
Lagerung bei RT	

**Hybridisierungspuffer**

Formamid	250 ml
20 x SSC	125 ml
Phosphatpuffer, 1M	25 ml
10 X Blocking-Puffer-Stammlösung	100 ml
SDS	35 g
N-Lauroylsarkosin	497 mg
Lachsspermien-DNA	25 mg

**UGT-AKTIVITÄT****Homogenisationspuffer (UGT)**

Tris	0,1 M
Pefabloc	2 mM
pH 7.8	

**Assay-Puffer**

Tris-HCl	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
BSA	0,05 %
pH 7.4	

**4-Methylumbelliferon-Lösung**

Stammlösungen in DMSO in folgenden Konzentrationen: 500 mM, 250 mM, 125 mM, 62,5 mM

→ jeweils 1:100 in DMSO verdünnen: 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM

→ jeweils 1:100 in Assay-Puffer verdünnen: 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM Endkonzentration

**DNA-DAPI-FÄRBUNG****DAPI-Stammlösung**

DAPI	3 mM
In Methanol gelöst	

**DAPI-Gebrauchslösung**

DAPI-Stammlösung	20 µM
in PBS	

**MESS- UND AUSWERTESOFTWARE**

CaryWin UV Bio 2.0

EasyWin Curve Fitting V 4.0a

GraphPad PRISM. 2.0 und 3.02

X-Fluor

Quantity One 4.0.1

Aida Image Analyzer

Varian, Darmstadt

Tecan, Crailsheim

GraphPad Software

Tecan, Crailsheim

Bio-Rad, München

Fujifilm über Raytest, Straubenhardt

## Anhang II: Tabellen und Abbildungen

Tabelle 14: Zusammensetzung des GTE und des synth. GTE

<sup>1</sup> Daten nach Glei (2003)

GRÜNTEEKATE- CHIN	GEHALT IM GTE [mg/g] <sup>1</sup>	MOLARE MASSE [g/mol]	MOLARITÄT [mM]	ANTEIL AM GT [%]
Catechin	19,0	290,3	6,5	8,4
EC	37,0	290,3	12,7	16,4
ECG	39,6	442,4	8,95	11,6
EGC	70,2	306,3	22,9	29,6
EGCG	98,1	458,4	21,4	27,7
Gallussäure	9,1	188,1	4,84	6,3

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen

PRIMER	SEQUENZ	PRODUKT- GRÖßE
GAPDH		
GAPDH forward	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	476 bp
GAPDH-T7 reward	5'-CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT CCA CCA CCC GTT TGC TGT AG-3'	
c-fos		
c-fos forward	5'-GGC AAG GTG GAA CAG TTA TC-3'	246 bp
c-fos-T7 reward	5'-CAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GTC ATT GAG GAG AGG CAG-3'	
c-jun (Gen- BankNr.J04111)		
c-jun forward	5'-TGC AAA GAT GGA AAC GAC CTT-3'	121 bp
c-jun-T7 reward	5'-CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC AGG TTC AGG GTC ATG CTC TG-3'	

*Tabelle 16: Anordnung der Gene auf dem „Drug Metabolism and Toxicology“-Array der Firma Superarray*

ABCB1 1	ABCB4 2	ABCC1 3	ABCC2 4	ABCC3 5	ABCC5 6	ABCG2 7	ACAT1 8
ACAT2 9	CHAT 10	CHST1 11	CHST2 12	CHST3 13	CHST4 14	CHST5 15	CHST6 16
CHST7 17	CHST8 18	COMT 19	CRAT 20	CST 21	CYP11A 22	CYP1A1 23	CYP1B1 24
CYP24 25	CYP2A6 26	CYP2B 27	CYP2C19 28	CYP2C8 29	CYP2C9 30	CYP2D6 31	CYP2E 32
CYP2F1 33	CYP3A4 34	CYP3A5 35	CYP3A7 36	CYP4A11 37	CYP4B1 38	CYP4F3 39	CYP7A1 40
CYP7B1 41	CYP8B1 42	DLAT 43	EPHX1 44	EPHX2 45	GSTA2 46	GSTA3 47	GSTA4 48
GSTM2 49	GSTM3 50	GSTM5 51	GSTP1 52	GSTT1 53	GSTT2 54	HAT1 55	HBOA 56
HNK1ST 57	HNMT 58	LABH1 59	NAT5 60	CYP-M 61	LTA4H 62	MGST1 63	MGST2 64
MGST3 65	MORF 66	MT1A 67	MT1E 68	MT1G 69	MT1H 70	MT1L 71	MT2A 72
MT3 73	MTIX 74	NAT1 75	NNMT 76	P450RA2 77	POR 78	STE 79	SULT1A1 80
SULT1A2 81	SULT1B1 82	SULT1C1 83	SULT C2 84	SULT2A1 85	SULT2B1 86	SULT4A1 87	TBXAS1 88
TPMT 89	TPST1 90	TPST2 91	UGT1A1 92	UGT2A1 93	UGT2B 94	UGT2B1 95	UGT2B4 96
PUC18 97	PUC18 98	PUC18 99	Blank 100	Blank 101	Blank 102	GAPD 103	GAPD 104
PPIA 105	PPIA 106	PPIA 107	PPIA 108	RPL13A 109	RPL13A 110	ACTB 111	ACTB 112

*Tabelle 17: Übersicht über die im „Drug Metabolism and Toxicology“-Array der Firma Superarray verwendeten Gene*

	Unigene	GeneBank	Symbol	Beschreibung	Gen
1	Hs.21330	NM_000927	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	PGY1,MDR1
2	Hs.73812	NM_000443	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	MDR3
3	Hs.391464	NM_004996	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	MRP1
4	Hs.193852	NM_000392	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	cMOAT, MRP2
5	Hs.90786	NM_003786	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	MOAT-D/MRP3
6	Hs.34744	NM_005688	ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	MRP5
7	Hs.194720	NM_004827	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	BCRP
8	Hs.37	NM_000019	ACAT1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	ACAT1
9	Hs.278544	NM_005891	ACAT2	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	ACAT2
10	Hs.302002	NM_020985	CHAT	Choline acetyltransferase	SLC18A3
11	Hs.104576	NM_003654	CHST1	Carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	CHST1
12	Hs.8786	NM_004267	CHST2	Carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	CHST2
13	Hs.158304	NM_004273	CHST3	Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3	CHST3

14	Hs.251383	NM_005769	CHST4	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4	CHST4
15	Hs.156784	NM_012126	CHST5	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	CHST5
16	Hs.157439	NM_021615	CHST6	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6	CHST6
17	Hs.138155	NM_019886	CHST7	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	CHST7
18	Hs.165724	NM_022467	CHST8	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8	CHST8
19	Hs.240013	NM_000754	COMT	Catechol-O-methyltransferase	COMT
20	Hs.12068	NM_000755	Crat	Carnitine acetyltransferase	CRAT
21	Hs.17958	NM_004861	CST	Cerebroside (3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3') sulfotransferase	CST
22	Hs.76205	NM_000781	CYP11A1	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	CYP11A
23	Hs.72912	NM_000499	CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1
24	Hs.154654	NM_000104	CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1
25	Hs.89663	NM_000782	CYP24A1	Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	CYP24
26	Hs.439056	NM_000762	CYP2A6	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	CYP2A6
27	Hs.1360	NM_000767	CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	CYP2B6
28	Hs.282409	NM_000769	CYP2C19	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	CYP2C19
29	Hs.282871	NM_000770	CYP2C8	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	CYP2C8
30	Hs.418127	NM_000771	CYP2C9	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	CYP2C9
31	Hs.333497	NM_000106	CYP2D6	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	CYP2D6
32	Hs.75183	NM_000773	CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	CYP2E
33	Hs.363140	NM_000774	CYP2F1	Cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1	CYP2F1
34	Hs.442527	NM_017460	CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4
35	Hs.150276	NM_000777	CYP3A5	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	CYP3A5
36	Hs.308638	NM_000765	CYP3A7	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	CYP3A7
37	Hs.1645	NM_000778	CYP4A11	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11	CYP4A11
38	Hs.436317	NM_000779	CYP4B1	Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1
39	Hs.106242	NM_000896	CYP4F3	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	CYP4F3
40	Hs.1644	NM_000780	CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	CYP7A1
41	Hs.144877	NM_004820	CYP7B1	Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	CYP7B1
42	Hs.447793	NM_004391	CYP8B1	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1	CYP8B1
43	Hs.115285	NM_001931	DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	DLAT
44	Hs.89649	NM_000120	EPHX1	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	EPHX1

45	Hs.212088	NM_001979	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2
46	Hs.446309	NM_145740	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	GST2
47	Hs.102484	NM_000847	GSTA3	Glutathione S-transferase A3	GSTA3
48	Hs.169907	NM_001512	GSTA4	Glutathione S-transferase A4	GSTA4
49	Hs.279837	NM_000848	GSTM2	Glutathione S-transferase M2 (muscle)	GSTM2
50	Hs.2006	NM_000849	GSTM3	Glutathione S-transferase M3 (brain)	GSTM3
51	Hs.75652	NM_000851	GSTM5	Glutathione S-transferase M5	GSTM5
52	Hs.411509	NM_000852	GSTP1	Glutathione S-transferase pi	GSTP1
53	Hs.268573	NM_000853	GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1	GSTT1
54	Hs.1581	NM_000854	GSTT2	Glutathione S-transferase theta 2	GSTT2
55	Hs.13340	NM_003642	HAT1	Histone acetyltransferase 1	HAT1
56	Hs.21907	NM_007067	MYST2	MYST histone acetyltransferase 2	HBOA
57	Hs.155553	NM_004854	CHST10	Carbohydrate sulfotransferase 10	HNK-1ST
58	Hs.42151	NM_006895	HNMT	Histamine N-methyltransferase	HNMT
59	Hs.375791	NM_032604	ABHD1	Abhydrolase domain containing 1	ABHD1/LABH1
60	Hs.109253	NM_016100	NAT5	N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	LOC51126
61	Hs.446065	NM_020674	CYP20A1	Cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1	CYP20A1
62	Hs.81118	NM_000895	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase	leukotriene A4 hydrolase
63	Hs.389700	NM_020300	MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1
64	Hs.81874	NM_002413	MGST2	Microsomal glutathione S-transferase 2	MGST2
65	Hs.212507	NM_004528	MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3
66	Hs.27590	NM_012330	MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	MORF
67	Hs.440939	NM_005946	MT1A	Metallothionein 1A (functional)	MT1A
68	Hs.418241	BC009699	MT1E	Metallothionein 1E (functional)	MT1E
69	Hs.433391	NM_005950	MT1G	Metallothionein 1G	Metallothionein 1G
70	Hs.438462	NM_005951	MT1H	Metallothionein 1H	metallothionein 1H
71	Hs.458273	X97261	MT1L	Metallothionein 1L	MT1L
72	Hs.418241	NM_005953	MT2A	Metallothionein 2A	Metallothionein 2A
73	Hs.73133	NM_005954	MT3	Metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic))	MT3
74	Hs.374950	NM_005952	MT1X	Metallothionein 1X	metallothionein 1X
75	Hs.458430	NM_000662	NAT1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	N-acetyltransferase
76	Hs.364345	NM_006169	NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT
77	Hs.91546	NM_019885	CYP26B1	Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	CYP26B1/P450RAI-2
78	Hs.354056	NM_000941	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	CYPOR
79	Hs.54576	NM_005420	SULT1E1	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	SULT1E1/STE
80	Hs.142	NM_001055	SULT1A1	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	SULT1A1
81	Hs.389536	NM_001054	SULT1A2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2	SULT1A2
82	Hs.129742	NM_014465	SULT1B1	Sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	SULT1B1
83	Hs.38084	NM_001056	SULT1C1	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1	SULT1C1
84	Hs.312644	NM_006588	SULT1C2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	SULT1C2
85	Hs.81884	NM_003167	SULT2A1	Sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA) –preferring, member 1	SULT2A1
86	Hs.406998	NM_004605	SULT2B1	Sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1	SULT2B1
87	Hs.189810	NM_014351	SULT4A1	Sulfotransferase family 4A, member 1	SULT4A1
88	Hs.444510	NM_001061	TBXAS1	Thromboxane A synthase 1 (platelet, cytoch-	CYP5A1 (thrombo-

				rome P450, family 5, subfamily A)	xane A synthase 1)
89	Hs.377402	NM_000367	TPMT	Thiopurine S-methyltransferase	TPMT
90	Hs.421194	NM_003596	TPST1	Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1
91	Hs.438649	NM_003595	TPST2	Tyrosylprotein sulfotransferase 2	TPST2
92	Hs.278896	NM_000463	UGT1A1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1	UGT1A1
93	Hs.225950	NM_006798	UGT2A1	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1	UGT2A1
94	Hs.278896	NM_007120	UGT1A10	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10	UGT1A4/UGT2B
95	Hs.201634	NM_001075	UGT2B10	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B10	UGT2B10
96	Hs.89691	NM_021139	UGT2B4	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4	UGT2B4
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100				Blank	
101				Blank	
102				Blank	
103	Hs.169476	NM_002046	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
104	Hs.169476	NM_002046	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
105	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Cyclophilin A
106	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Cyclophilin A
107	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Cyclophilin A
108	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Cyclophilin A
109	Hs.449070	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
110	Hs.449070	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
111	Hs.426930	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
112	Hs.426930	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin

*Tabelle 18: Durch Grüntee catechine bzw. EGCG induzierte Modulation der Aktivität der ERK in humanen Zelllinien unterschiedlichen Transformationsstadiums*

↑ Erhöhung der ERK-Aktivität; - keine Modulation der ERK-Aktivität; ↓ Erniedrigung der ERK-Aktivität

ZELLINIE (GEWEBE)	SUBSTANZ (KONZ.)	ERK- PHOSPHO- RYLIERUNG	DAUER DER INKUBATION	QUELLE
LT97 (Kolon)	GTE (2-20 µM EGCG- Äquivalente)	–	Bis 48 h	vorliegende Arbeit
HT29 clone 19 a (Kolon)	GTE (2-20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	
	EGCG (8 µM)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	
HT29 (Kolon)	GTE (2-20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (bis 8 h)	Bis 48 h	
	EGCG (8 µM)	↑ (bis 8 h)	Bis 48 h	
	EGCG (100 µM)	↑ (15 -240 min)	Bis 240 min	(Chen et al., 2003)
	EGCG (10 µM)	↑	1 h	(Chen et al., 2003)
	GTE (2, 8 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (5-10 min)	bis 1 h	(Kautenburger, 2000)
Keratinocyten (Haut)	EGCG (44 µM)	↑ (15-30 min)	Bis 24 h	(Balasubramanian et al., 2002)
HepG2-C8 (Hepatom)	EGCG (250 µM)	↑	2 h	(Chen et al., 2000)
	EGC (250 µM)	↑	2 h	
	EGCG (250 µM)	↑ (60 - 180 min)	Bis 180 min	
HepG2 (Hepatom)	Grüntee polyphenol- Extrakt (250 µg/ml)	↑ (5-240 min)	Bis 240 min	(Yu et al., 1997)
Raw264.7 (Makrophagen)	EGCG (75 µM)	↑ (10-20 min)	Bis 60 min	(Park et al., 2001)
NIH-pATMras (Fibroblasten)	EGCG (20 µM)	–	12 h	(Wang und Bach- rach, 2002)
HT1080 (Fibro- sarkom)	EGCG (22 µM)	↓	1 h	(Maeda-Yamamoto et al., 2003)
	EGCG (bis 100 µM)	↓	8 h	(Kim et al., 2004)
LNCaP (Prosta- ta)	EGCG (bis 88 µM)	↑ (12 h, 24 h)	12 h, 24 h	(Siddiqui et al., 2004)
DU 145 (Prosta- ta)	EGCG (bis 88 µM)	↑ (12 h, 24 h)	12 h, 24 h	



*Tabelle 19: Durch Grüntee catechine bzw. EGCG induzierte Modulation der Aktivität der JNK in humanen Zelllinien unterschiedlichen Transformationsgrades*

↑ Erhöhung der JNK-Aktivität; - keine Modulation der JNK-Aktivität; ↓ Erniedrigung der JNK-Aktivität; n.d. nicht detektierbar

ZELLINIE (GEWEBE)	GRÜNTEEKATECHIN (KONZENTRATION)	JNK- PHOSPHO- RYLIERUNG	DAUER DER INKUBATION	QUELLE
HT29 clone 19 a (Kolon)	GTE (2-20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	vorliegende Arbeit
	EGCG (8 µM)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	
HT29 (Kolon)	GTE (20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	
	EGCG (8 µM)	↑ (bis 48 h)	Bis 48 h	
	EGCG (100 µM)	↑ (30 -240 min)	Bis 240 min	(Chen et al., 2003)
	EGCG (250 µM)	↑	1 h	
HT29 C4 (Kolon)	EGCG (100 µM)	↑ (1 h)	1 h	(Jeong et al., 2004)
	EGC (100 µM)	—		
	ECG (100 µM)			
	EC (100 µM)			
Keratinozyten (Haut)	EGCG (44 µM)	—	Bis 24 h	(Balasubramanian et al., 2002)
HepG2- C8(Hepatom)	EGCG (25 µM)	↑	2 h	(Chen et al., 2000)
	EGCG (250 µM)	↑ (30 – 180 min)	Bis 180 min	
	EGCG (250 µM)	↑	2 h	
HepG2 (Hepatom)	Grüntee polyphenol- Extrakt (250 µg/ml)	↑ (15-240 min)	Bis 240 min	(Yu et al., 1997)
Raw264.7 (Makropha- gen)	EGCG (75 µM)	↑ (10-30 min)	Bis 60 min	(Park et al., 2001)
HT1080 (Fibrosarkom)	EGCG ( bis 22 µM)	—	1 h	(Maeda- Yamamoto et al., 2003)
	EGCG (bis 100 µM)	n.d.	8 h	(Kim et al., 2004)

*Tabelle 20: Durch Grüntee catechine bzw. EGCG induzierte Modulation der Aktivität der p38 in humanen Zelllinien unterschiedlichen Transformationsgrades*

↑ Erhöhung der p38-Aktivität; - keine Modulation der p38-Aktivität; ↓ Erniedrigung der p38-Aktivität

ZELLINIE (GEWEBE)	GRÜNTEEKATECHIN (KONZENTRATION)	P38 PHOSPHO- RYLIERUNG	DAUER DER INKUBATION	QUELLE
HT29 clone 19 a (Kolon)	GTE (20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (4-48 h)	bis 48 h	vorliegende Arbeit
	EGCG (8 µM)	↑ (24-48 h)	bis 48 h	
HT29 (Kolon)	GTE (2-20 µM EGCG- Äquivalente)	↑ (48 h)	bis 48 h	
	EGCG (8 µM)	—	bis 48 h	
	EGCG (100 µM)	↑ (5 -240 min)	bis 240 min	(Chen et al., 2003)
	EGCG (ab 50 µM)	↑	1 h	
Keratinozy- ten (Haut)	EGCG (44 µM)	↑	bis 24 h	(Balasubramanian et al., 2002)
HepG2-C8 (Hepatom)	EGCG (50 µM)	↑	2 h	(Chen et al., 2000)
	EGC (250 µM)	↑	2 h	
	EGCG (250 µM)	↑ (90 - 180 min)	bis 180 min	
	Grüntee polyphenol- Extrakt (250 µg/ml)	↑	2 h	
HT1080 (Fibrosar- kom)	EGCG ( bis 22 µM)	↓	1 h	(Maeda-Yamamoto et al., 2003)
	EGCG (bis 100 µM)	↑	8 h	(Kim et al., 2004)

**Tabelle 21: Übersicht über die vergleichende Auswertung der cDNA Arrays (n=2) von HT29 und LT97 Zellen nach Behandlung mit 2 µM bzw. 8 µM EGCG-Äquivalenten GTE**

Verglichen werden die Auswertungsmethoden „Scatter Plot“<sup>1</sup>, „Fold Change“<sup>2</sup> und der „Golub Faktor“<sup>3</sup> (Golub et al., 1999), der in der Literatur auch als „signal to noise ratio“ bezeichnet wird. Nur bei Übereinstimmung in allen drei Auswertungsmethoden wurde angenommen, dass das betreffende Gen differenziell exprimiert wurde.

<sup>1</sup> Alle Genexpressionswerte die höher bzw. niedriger als die zweifache Standardabweichung des Genexpressionsverhältnisses von unbehandelten zu behandelten Zellen sind, gelten als differenziell exprimiert).

<sup>2</sup> Dieser Wert gibt an, um wieviel die Expression eines Genes der behandelten Zellen sich von der Expression eines Genes der Kontrollzellen unterscheidet; alle Gene, deren Fold Change Werte ergibt, die größer 1,5 bzw. kleiner -1,5 sind, gelten als differenziell exprimiert)

<sup>3</sup> Je höher der Zahlenwert des Golub-Kriteriums, umso sicherer ist ein Gen differenziell exprimiert. Es wurde ein Ranking durchgeführt; als differenziell exprimiert galten nur die jeweils 10 größten Werte, die für den Golub-Faktor errechnet werden konnten.

Methode		"Fold Change"				"Scatter Plots"				"Golub factor" (Ranking)			
Zelllinie		HT29		LT97		HT29		LT97		HT29		LT97	
GTE [EGCG Äquivalente]		2 µM	8 µM	2 µM	8 µM	2 µM	8 µM	2 µM	8 µM	2 µM	8 µM	2 µM	8 µM
Arzneimittel-Transporter													
Metallo-thioneine	MT1A	1.03	1.12	-1.07	-1.20					0.09 (29)	0.10 (31)	0.05 (28)	0.13 (25)
	MT1E	1.17	1.36	-1.02	-1.05					0.52 (13)	1.27 (4)	0.03 (30)	0.06 (30)
	MT1G	-1.02	1.19	-1.01	-1.16			+		0.22 (24)	0.31 (19)	0.01 (32)	0.13 (25)
	MT1H	1.01	1.36	-1.02	-1.03					0.29 (20)	0.33 (18)	0.02 (31)	0.03 (32)
	MT1L	-1.25	-1.11	-1.10	-1.06					0.16 (26)	0.28 (21)	0.11 (26)	0.07 (29)
	MT2A	1.03	1.09	1.09	-1.06					0.04 (32)	0.05 (35)	0.05 (28)	0.04 (31)
	MT3	1.33	1.66	1.23	1.16					0.52 (13)	1.59 (2)	0.22 (19)	0.18 (23)
P-Glyco-protein Familie	MT1X	-1.01	1.05	-1.04	-1.22			+		0.16 (26)	0.17 (29)	0.04 (29)	0.21 (21)
	ABCB1	-	-	-1.56	1.00					-	-	0.39 (11)	0.00 (35)
	ABCC2	2.09	3.68	-1.60	1.40	+	+			1.58 (2)	1.14 (6)	0.68 (6)	0.85 (7)
	ABCC3	1.06	1.10	1.12	1.08					0.20 (25)	0.19 (27)	0.15 (24)	0.11 (26)
	ABCG2	-1.04	1.01	-1.38	-1.01					0.03 (33)	0.02 (37)	0.48 (9)	0.04 (31)
Phase I metabolisierende Enzyme													
CYPs	CYP2B	-1.09	1.06	-1.10	-1.11					0.26 (21)	0.14 (30)	0.08 (27)	0.10 (27)
	CYP2F1	1.00	2.01	-	-		+			0.57 (10)	0.53 (13)	-	-
	CYP3A5	1.41	1.81	-	-		+			1.41 (4)	0.98 (8)	-	-
	CYP3A7	1.69	1.57	-	-	+				0.29 (20)	0.30 (20)	-	-
	CYP4F3	-1.12	1.14	-1.19	-1.01					0.24 (22)	0.18 (28)	0.18 (23)	0.01 (34)
Housekeeping Genes													
	ACTB	-1.04	-1.20	1.34	1.17				+	0.22 (24)	0.21 (25)	0.26 (17)	0.16 (24)
	GAPDH	-1.10	-1.43	1.13	-1.08		+		+	0.20 (25)	0.75 (9)	0.11 (26)	0.10 (34)
	RLP13A	-1.45	-1.64	1.25	1.67	+	+		+	0.54 (12)	0.68 (10)	0.70 (6)	0.60 (12)
	PPIA1	1.10	-1.12	1.09	1.04		+			0.56 (11)	0.52 (14)	0.05 (28)	0.04 (31)
Phase II metabolisierende Enzyme													
Acetyl-transferasen	ACAT1	1.07	1.11	-1.59	-1.27			+		0.34 (18)	0.23 (24)	0.74 (5)	0.78 (8)
	ACAT2	1.08	1.05	-1.09	-1.27				+	0.08 (30)	0.09 (33)	0.08 (27)	0.26 (20)
	CHAT	1.31	2.18	-1.56	-1.11			+		1.17 (5)	0.53 (13)	1.79 (1)	0.2 (22)
	CRAT	-1.27	1.26	1.31	2.08				+	0.47 (14)	0.38 (16)	1.52 (2)	1.58 (2)
	DLAT	1.28	1.21	1.09	1.51	+				0.33 (19)	0.30 (20)	0.04 (29)	0.30 (18)
	HAT1	-	-	1.27	1.62					-	-	0.14 (25)	0.43 (15)
	NAT1	-	-	-1.09	1.24					-	-	0.29 (16)	0.65 (11)
Epoxide-hydrolasen	LOC51126	1.25	1.08	1.10	1.59	+			+	0.14 (27)	0.24 (23)	0.08 (27)	0.74 (9)
	EPHX1	1.37	1.57	1.46	2.44	+	+		+	0.72 (7)	1.00 (7)	0.77 (4)	1.38 (4)
GSTs	LT44H	1.24	-1.01	-	-					0.01 (35)	0.01 (38)	-	-
	GSTM5	-	-	-1.04	1.37					-	-	0.11 (26)	0.47 (14)
	GSTP1	1.09	1.10	-1.03	1.02					0.62 (8)	0.60 (12)	0.03 (30)	0.02 (33)
	GSTT2	-1.18	-1.02	-1.02	1.00					0.04 (32)	0.06 (34)	0.02 (31)	0.00 (35)
	MGST1	1.04	-1.01	-1.01	1.22					0.02 (34)	0.03 (36)	0.00 (33)	0.16 (24)
	MGST2	-1.02	-1.02	1.21	1.48					0.03 (33)	0.05 (35)	0.32 (14)	0.92 (6)
Methyl-transferasen	MGST3	1.16	1.02	-1.16	-1.27				+	0.06 (31)	0.08 (33)	0.19 (22)	0.31 (17)
	COMT	-1.43	1.22	1.08	1.34	+				0.35 (17)	0.21 (25)	0.24 (18)	1.12 (5)
	HNMT	1.24	1.11	1.13	1.33	+			+	0.16 (26)	0.20 (26)	0.36 (13)	0.56 (13)
Sulfo-transferasen	NNMT	1.42	1.32	-	-					1.42 (3)	0.47 (15)	-	-
	CHST6	1.06	1.09	-1.27	-1.16				+	0.29 (20)	0.27 (22)	0.30 (15)	0.27 (19)
	CHST7	-1.03	1.68	-1.03	1.84			+	+	0.58 (9)	1.16 (5)	0.04 (29)	1.51 (3)
	HNK-1ST	1.20	1.49	-1.09	-1.04			+		0.80 (6)	1.57 (3)	0.20 (21)	0.09 (28)
	SULT1A1	-1.49	-1.66	1.79	1.87	+	+		+	0.29 (20)	0.37 (17)	0.43 (10)	0.42 (16)
	SULT1A2	-1.66	-1.54	-	-	+	+			0.39 (16)	0.47 (15)	-	-
UGTs	TPST1	1.68	2.11	1.70	2.40				+	0.45 (15)	0.64 (11)	0.51 (8)	2.44 (1)
	UGT1A1	1.50	1.45	1.20	1.31	+	+		+	1.90 (1)	2.30 (1)	0.38 (12)	0.42 (16)
	UGT2B	1.16	-1.03	1.21	1.34				+	0.13 (28)	0.08 (33)	0.78 (3)	0.72 (10)
	UGT2B10	-1.33	1.00	1.03	1.14					0.23 (23)	0.00 (39)	0.21 (20)	0.74 (9)

Tabelle 22: Zusammenfassende Darstellung der *GSTP1*mRNA Expression in HT29 und LT97 Zellen

$n = 4$  (HT29),  $n = 3$  (LT97); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; One Way ANOVA mit Bonferroni Post Test

	ZELLINIE	HT29	
	Inkubationszeit	24 h	48 h
GTE-Konz. [ $\mu$ M EGCG-Äquivalente]	0	100 % $\pm$ 0 %	100 % $\pm$ 0 %
	2	82,9 % $\pm$ 5,5 %	71,8 % $\pm$ 9,4 %*
	8	77,2 % $\pm$ 16,4 %	62,5 % $\pm$ 14 %**
	ZELLINIE	LT97	
	Inkubationszeit	24 h	48 h
GTE-Konz. [ $\mu$ M EGCG-Äquivalente]	0	100 % $\pm$ 0 %	100 % $\pm$ 0 %
	2	107 % $\pm$ 11,3 %	100,4 % $\pm$ 5,3 %
	8	93,9 % $\pm$ 7,1 %	102 % $\pm$ 1,9 %

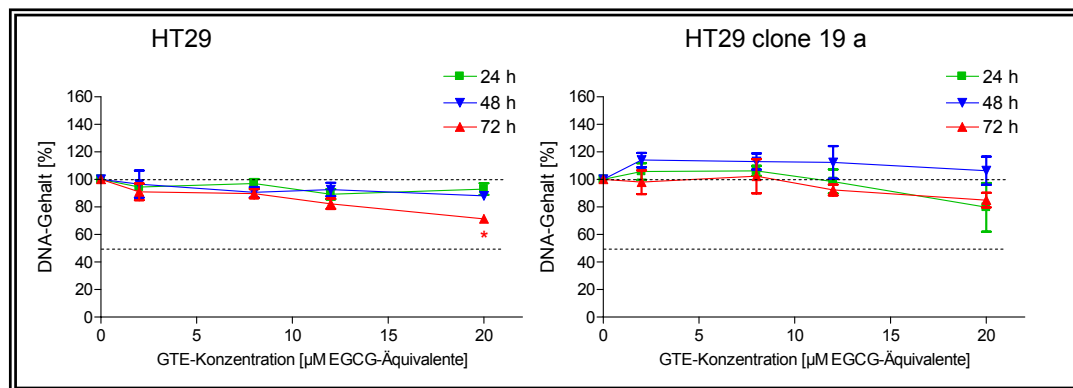


Abbildung 46: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit GTE (bis 20  $\mu$ M EGCG-Äquivalente) nach 24, 48 und 72 h unter serumhaltigen Bedingungen (10 % FCS), gemessen mittels DNA-DAPI-Färbung

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 3$  (HT29)

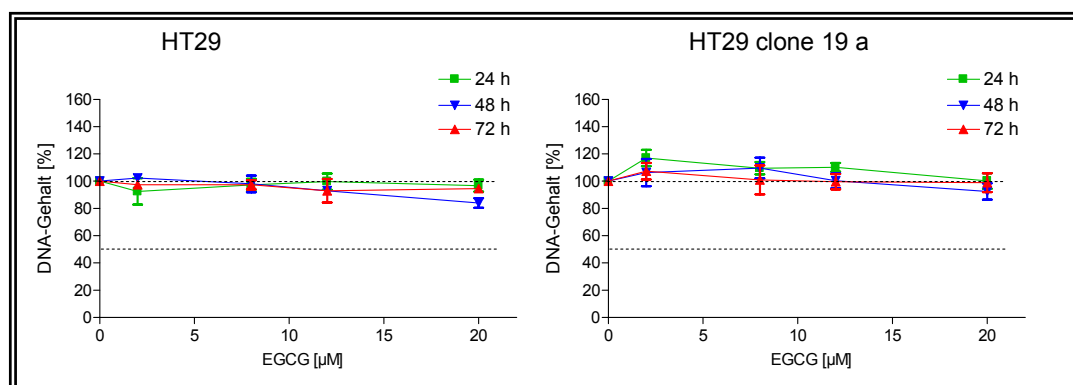


Abbildung 47: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in HT29 clone 19 a und HT29 Zellen nach Inkubation mit EGCG (bis 20  $\mu$ M) nach 24, 48 und 72 h unter serumhaltigen Bedingungen (10 % FCS), gemessen mittels DNA-DAPI-Färbung

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$ , One-way-ANOVA mit Bonferroni Post Test,  $n = 4$  (HT29 clone 19 a),  $n = 3$  (HT29)

Tabelle 23: Die durch EGCG verursachte Wachstumshemmung ( $EC_{50}$ ) in humanen Krebszelllinien

GEWEBE	ZELLINIE	EC <sub>50</sub> VON EGCG [ $\mu$ M]	DAUER DER INKUBATION	QUELLE
Mundhöhle	1483HNSCC	18	5 d	(Khafif et al., 1998)
Lunge	H661	22	2 h	(Yang et al., 1998b)
	H1299			
Leber	HepG2	147,3	3 d	(Kuo und Lin, 2003)
		142	3 d	(Uesato et al., 2001)
	HepG2-C8	500	1 d	(Chen et al., 2000)
Brust	MCF-7	120	6 d	(Valcic et al., 1996)
Kolon	HCT 116	46	3 d	(Uesato et al., 2001)
	Caco-2	40	4 d	(Chen et al., 1998)
	HT29	86	6 d	(Valcic et al., 1996)
		67	2 d	(Yang et al., 1998b)
		100	1,5 d	(Chen et al., 2003)
	FHC	250	1,5 d	
	HT29 clone 19 a	85	1 d	(Glei et al., 2003)
		60	1 d	(Glei et al., 2003)
	HT29	11,7	3 d	(Jahn, 2004)
		13,0	3 d	Vorliegende Arbeit
	HT29 clone 19a	16,8	3 d	

## **DANK**

Ein herzliches Dankeschön ergeht an Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel dafür, dass sie mich für ihr Forschungsgebiet begeistert und mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses vielseitige und interessante Promotionsthema am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu bearbeiten. Ihre stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion hat diese Arbeit erst zu dem gemacht, was sie ist.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie, insbesondere Gaby Beyer-Sehlmeyer, Annett Klinder, Michael Gleis, Anja Schäferhenrich, Miriam Ebert, Selveraju Veeriah, Stefanie Kühler, Claudia Steiner, Nina Habermann, Stefanie Klenow, Eva Gietl, Marian Raschke, Carola Ruhe, Nancy Jahn und Thomas Hofmann. Esther Woschke, Eva Möller und Edda Lösche danke ich herzlich für die technische Unterstützung im Labor.

Herrn PD Dr. Frank Böhmer und Herrn Kamal Kumar Balasubramanian danke ich für die Möglichkeit, die Reporterassays am Institut für molekulare Zellbiologie des Klinikums der FSU durchführen zu können. An Herrn Prof. Stefan Wölfl ergeht mein Dank für die Bereitstellung der CCD-Kamera sowie für die wertvolle Hilfestellung bei der Auswertung der Arrays.

Michael Gleis, Nina Habermann, Carola Ruhe, Thomas Hofmann und vor allem Stefanie Klenow danke ich fürs kritische Korrekturlesen der Arbeit und die damit verbundene Mühe.

Mein Dank gilt der Deutschen Krebshilfe, welche diese Arbeit teilweise finanziert hat (10-1572-Po1) sowie der Firma VK Mühlen für die Bereitstellung des Grünteeextrakts.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Freunden, die mir in den letzten Jahren zur Seite standen. Ein besonderes Dankeschön ergeht an Wiebke Ahlfs, Volker Andres, Matthias John, Doreen Kirchberg sowie den Jenaer Saufkreis.

Meinen Eltern Karin und Ernst Kautenburger danke ich sehr für die Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne den Rückhalt meiner Familie hätte ich die nötige Kraft zur Promotion nicht aufbringen können.

Für die Freude und die unerschöpfliche Ruhe, die er in mein Leben gebracht hat, bin ich Sascha Jaeck unendlich dankbar. Seine stete Rücksicht und Motivation hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, den 6. Dezember 2004

## LEBENS LAUF

Name: Tanja Kautenburger

Geboren: 10. August 1974

Familienstand: verheiratet mit Sascha Jaeck

### Schulausbildung

1980-1984

Kreuzberg Grundschule, Merzig

1984-1993

Peter Wust Gymnasium Merzig

30. Juni 1993

Allgemeine Hochschulreife

### Ausbildung

1993-1995

Ausbildung zur staatlich anerkannten städtischen Hauswirtschaftlerin in der Fremdenpension M. Gorges, Waldhölzbach

### Studium

1995-2000

Studium der Ernährungswissenschaften am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

11.8.2000

Abschluss als Diplom-Trophologin

### Postgraduale Ausbildung

2000- 2004

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie (Frau Prof. Dr. B. L. Pool-Zobel), Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena

### Veröffentlichungen

M.N. Ebert, G. Beyer-Sehlmeyer, U.M. Liegibel, **T. Kautenburger**, T.W. Becker, B. L. Pool-Zobel (2001); Butyrate Induces Glutathione S-Transferase in Human Colon Cells and Protects From Genetic Damage By 4-Hydroxy-2-Nonenal.; Nutrition and Cancer 41 (1&2), 156 –164. 2001.

B.L. Pool-Zobel, S. Veeriah, J. Sauer, **T. Kautenburger**, J. Kiefer, K.K. Richter, M. Soom, S. Wölfl (2005); Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumour human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes.  
akzeptiert

**T. Kautenburger**, T.W. Becker, B.L. Pool-Zobel (2005); Low concentrations of catechins transiently induce and inhibit MAPK signal transduction and growth of human colon tumor cells.  
akzeptiert

**T. Kautenburger**, G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, N. Haag, S. Kühler, A. Küchler, A. Weise, B. Marian, W.H.M. Peters, T. Liehr, U. Claussen, B.L. Pool-Zobel (2005); The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells.  
eingereicht

**T. Kautenburger**, M. Gleis, M. Raschke, B.L. Pool-Zobel (2004); Green tea extract (GTE) induces uridine diphosphate glucuronosyl transferases (UGTs) in human colon HT29 cells, a possible mechanism of antigenotoxicity and chemoprotection.  
eingereicht